

**Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie per l'Innovazione Industriale**

**XXIV° ciclo**



**SAPIENZA**  
**UNIVERSITÀ DI ROMA**

**Tesi di dottorato**

**“Materiali elettrodici per lo sviluppo di sensori e  
biosensori di interesse biologico e alimentare”**

**Dottoranda**

**Chiara Bianchini**

**Docente di riferimento**

**Prof.re Mauro Pasquali**

**Tutor guida**

**Dott.ssa Daniela Zane**

**Anno Accademico**

**2010-2011**

## Indice

<b>Introduzione</b> .....	pag. 4
<b>Capitolo 1: Sensori e biosensori</b> .....	pag. 8
1.1 I sensori.....	pag. 8
1.2 I biosensori.....	pag. 9
<b>Capitolo 2: Analiti di interesse biologico e patologie</b> .....	pag. 12
2.1 Analiti studiati in questo lavoro.....	pag. 12
<b>Capitolo 3: Materiali polimerici</b> .....	pag. 27
3.1 I polimeri non-conduttori.....	pag. 30
3.2 I polimeri conduttori.....	pag. 31
3.3 Polipirrolo overossidato come polimero non-conduttore.....	pag. 36
3.4 Poli(etereuretano acido) come polimero non-conduttore.....	pag. 37
3.5 Poli(3,4-etilendiossi)tiofene come polimero conduttore.....	pag. 40
<b>Capitolo 4: Nanotecnologie</b> .....	pag. 45
4.1 Nanotecnologie e nanoscienze.....	pag. 45
4.2 Nanomateriali.....	pag. 46
4.3. Nanotubi d'oro.....	pag. 47
4.3.1 Nanoelettrodi d'oro.....	pag. 49
4.3.2 Sintesi dei nanotubi d'oro .....	pag. 53
<b>Capitolo 5: I liquidi ionici</b> .....	pag. 56
5.1 Generalità.....	pag. 56
5.2 PYR <sub>14</sub> TFSI.....	pag. 57

<b>Capitolo 6: Tecniche elettrochimiche</b>	pag. 60
6.1 Voltammetria ciclica (VC)	pag. 60
6.2 Spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS)	pag. 62
6.3 Amperometria	pag. 66
6.4 Voltammetria differenziale ad impulsi (DPV)	pag. 67
<b>Capitolo 7. Parte sperimentale</b>	pag. 69
7.1 Materiali utilizzati	pag. 69
7.2 Strumenti	pag. 70
7.3 Pulizia degli elettrodi	pag. 71
<b>Capitolo 8. Condizioni sperimentali e risultati e discussione</b>	pag. 72
8.1 Polipirrolo overossidato: condizioni sperimentali	pag. 72
8.2 Polipirrolo overossidato: risultati e discussione	pag. 74
8.3 Nanotubi d'oro: condizioni sperimentali	pag. 96
8.4 Nanotubi d'oro: risultati e discussione	pag. 102
8.5 Poli(3,4-etilendirossi)tiofene: condizioni sperimentali	pag. 117
8.6 Poli(3,4-etilendirossi)tiofene: risultati e discussione	pag. 120
8.6.1 Determinazione analitica dell'acido caffeico nel vino	pag. 154
8.7 Poli(3,4-etilendirossi)tiofene e polietere uretano acido	pag. 165
8.8 Conclusioni	pag. 179
<b>Bibliografia</b>	pag. 181
<b>Attività formative</b>	pag. 198
<b>Pubblicazioni</b>	pag. 200
<b>Ringraziamenti</b>	pag. 201

## Introduzione

La percezione di ciò che ci circonda è essenziale per tutte le forme di vita. Ciò determina l'esistenza di un'affascinante ricchezza e diversità dei sistemi sensoriali in tutto il regno animale e vegetale.

I due collegamenti principali fra la biologia e l'ingegneria sono la "biotecnologia" e la "bionica" e grazie all'applicazione del calcolo matematico è possibile integrare i principi dell'una in quelli dell'altra.

Infatti, il biologo, da un lato, sarà in grado di fornire le istruzioni su come trattare, conservare e manipolare le molecole "sonda", come proteine, acidi nucleici o interi microorganismi, mentre l'ingegnere, dall'altro canto, sarà in grado di sviluppare il dispositivo sensoristico e contemporaneamente sarà in grado offrire la sua conoscenza per trarre ispirazione per la progettazione di suddetti dispositivi.

La serie di eventi che si trova fra la ricognizione di uno stimolo particolare, in input, e la generazione dei segnali quantificabili, in output, quali, ad esempio, i potenziali di azione, è la seguente per tutte le tipologie di sensori biologici:

1. Riconoscimento dello stimolo e trasformazione
2. Trasduzione dello stimolo
3. Codifica del segnale

Ci sono alcune difficoltà nell'interazione fra la biologia e l'ingegneria poiché, talvolta, queste due discipline possono entrare in conflitto con il procedere della cooperazione. Infatti, quando un ingegnere deve progettare un dispositivo, egli conosce precisamente quali sono gli obiettivi che devono essere raggiunti e le condizioni nell'ambito in cui lavora che devono essere soddisfatte per ottenere tale scopo.

La ricerca biologica, invece, è molto spesso un genere di "ingegneria a rovescio" poiché si occupa di strutture complesse le cui funzioni dettagliate e i principi che ne sono alla base molto spesso sono ancora privi di spiegazione scientifica.

Chiaramente, il termine "progettare" o "progetto" sono errati in biologia poiché essa procede sotto l'impulso di una moltitudine di fattori selettivi, con errori e variazioni che possono essere associati a informazioni genetiche trasmissibili da una generazione all'altra [1].

L'evoluzione della ricerca nel settore della biosensoristica cambiò dagli anni '70, in quanto era inizialmente improntata sullo sviluppo della microelettronica, ai successivi anni '80, durante i quali ebbero la priorità la ricerca nel campo dei materiali, fino all'inizio degli anni '90, dove il lavoro di sviluppo fu indirizzato principalmente nel campo della miniaturizzazione e dell'integrazione con unità funzionali sempre più piccole all'interno di tali sistemi, dalla micro alla nanotecnologia, dalle unità molecolari fino a quelle atomiche, fino a utilizzare i fenomeni della fisica e della chimica dei quantum.

In parte, però, lo sviluppo dei sensori e biosensori non ha potuto stare al passo con quello tumultuoso delle componenti della microelettronica poiché è comunque difficile adattare la metodologia di ricerca tipica dell'ingegneria dei materiali a quella che caratterizza la biologia.

Per questo motivo, solo nell'ultimo decennio, grazie alla scoperta dei materiali polimerici, i sensori hanno avuto una vera e propria fase di sviluppo nel senso che i ricercatori hanno iniziato a puntare, grazie ad essi, al raggiungimento della miniaturizzazione e all'aumento dell'integrazione per l'elaborazione dei segnali nell'ambito di un unico dispositivo sensoristico.

Ciò sta dando sostanzialmente più importanza alle tecnologie che consentono la fabbricazione di dispositivi sensoristici e biosensoristici a basso costo sia per quanto concerne i materiali e sia per quanto riguarda l'elettronica [2-5].

Dalla combinazione del materiale biologico con le componenti dell'ingegneria sarà sempre più possibile ottenere sistemi che consentiranno di aumentare la selettività, la sensibilità e il limite di rilevabilità e contemporaneamente si riuscirà ad ottenere una diminuzione del dispendio energetico, di quello economico e, non meno importante, dell'impatto ambientale.

I biosensori possono essere considerati, perciò, come un link fra la biologia e l'ingegneria (in particolar modo quella elettrica e quell'elettronica). Infatti, essi consentono di mettere a punto innovative metodologie di misurazione che apportano vantaggi importanti nella medicina, nella protezione dell'ambiente, nella tecnologia dell'alimentazione e in altri campi, come ad esempio quello della progettazione e veicolazione farmaceutica [6].

In generale, stanno emergendo, per i biosensori, le seguenti linee di applicazioni:

1. Nei sistemi diagnostici in medicina, nel controllo dei pazienti nelle cure intensive e nell'analisi dei malati a lunga degenza
2. Nelle analisi ambientali, soprattutto quelle delle acque di scarico e nel controllo dell'inquinamento
3. Nel controllo di qualità degli alimenti, per esempio, per valutare il grado purezza e di freschezza
4. Nei test di controllo dei processi produttivi nell'industria farmaceutica
5. Nei test anti doping e antidroga

Questi dispositivi diventano sempre più sensibili perché le molecole biologiche, sempre più ingegnerizzate grazie alle tecniche del DNA ricombinante, sono caratterizzate da un'altissima selettività nel riconoscimento degli specifici analiti.

Le analisi possono essere fornite considerevolmente più velocemente e anche più attendibilmente di prima e quasi in continuo.

Un altro vantaggio è che queste analisi possono essere fatte direttamente "in situ" e "in vivo" anziché in laboratorio.

Quindi, attualmente è possibile ottenere non solo una riduzione distinta dei costi per misura, ma, inoltre, è possibile ottenere una riduzione dell'uso di composti chimici potenzialmente tossici sia per l'uomo sia per l'ambiente.

Le sonde biologiche si basano su una peculiare caratteristica che permette loro il riconoscimento specifico di un particolare composto o di una classe di composti secondo il principio "chiave-serratura".

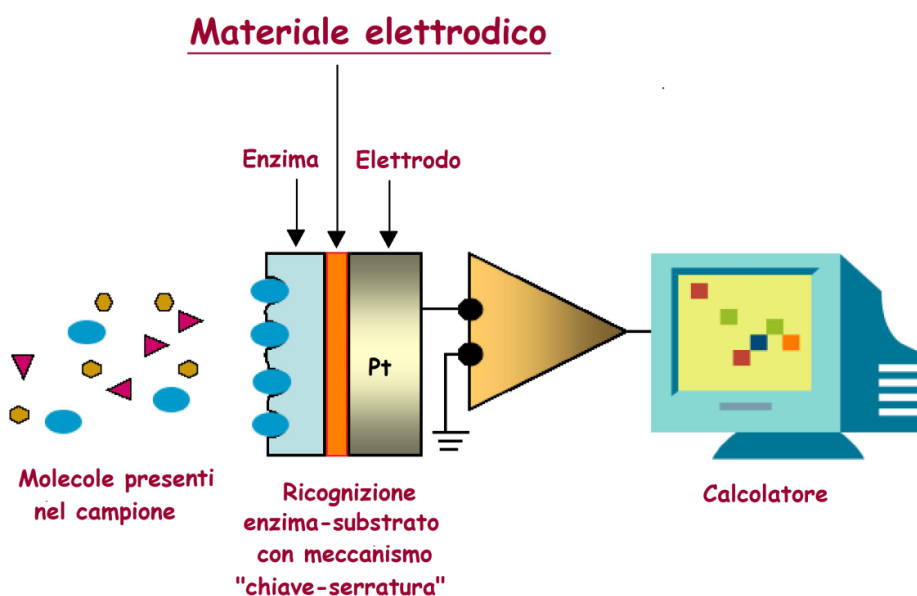
Il numero degli analiti possibili (chiavi) è virtualmente illimitato a condizione che essi si adattino perfettamente al sito di riconoscimento (serrature) delle molecole biologiche utilizzate per l'assemblaggio del dispositivo sensoristico. Inoltre fra gli analiti ci possono essere sia sostanze organiche sia inorganiche.

La reazione chimica del materiale biologico con l'analita di interesse altera i parametri chimico-fisici dell'interfase quale ad esempio il potenziale elettrico, la massa, la fluorescenza o la temperatura. Questi cambiamenti sono convertiti in segnali amplificati e successivamente misurati.

In questo modo è possibile effettuare analisi che finora erano state possibili soltanto tramite scrupolosi processi di estrazione dell'analita dalle matrici complesse dei campioni reali o mediante analisi effettuate su animali da laboratorio.

In generale, tali componenti biologiche sono immobilizzate su membrane, solitamente di natura polimerica o metallica, in modo tale che gli analiti possono diffondere dalla matrice del campione fino alla membrana dove vengono trasformati cataliticamente in sostanze in grado di generare un segnale processabile ad opera di un adatto trasduttore sottostante la membrana.

Gli analiti diffondono dal campione fino alla membrana e reagiscono con la componente biologica. Questa reazione genera un segnale quindi trasformato dal trasduttore e quantificato da un calcolatore.



**Figura 1** Schema di funzionamento di un dispositivo biosensoristico interfacciato a un calcolatore.

Attualmente i biosensori fino ad ora descritti permettono la determinazione di circa 120 analiti differenti. Fra questi, ci sono quelli per le sostanze a basso peso molecolare, quelli per le macromolecole, quelli basati su reazioni enzimatiche di tipo “chiave-serratura”, e quelli per i virus, per i microorganismi basati sulla reazione antigene-anticorpo, quelli per gli inquinanti ambientali, ecc.

Tuttavia, la maggior parte di questi dispositivi sono ancora a un livello iniziale di sviluppo in quanto si cerca sempre di ottimizzare la rapidità di risposta, la sensibilità e, nel caso di analisi “in vivo”, la tollerabilità e l’assenza di proprietà emoagglutinanti dei materiali che costituiscono tutto il dispositivo. Quindi, nel campo della biosensoristica, la nanotecnologia e l’ingegneria dei materiali stanno assumendo sempre più importanza e stanno diventando decisive per il successo nel mercato economico mondiale [7].

## Capitolo 1: Sensori e biosensori

### 1.1 I sensori

Il principio di funzionamento di uno strumento in grado di fornire la misura di una grandezza si basa su tre stadi: rilevazione della grandezza da misurare, modificazione del segnale ottenuto dal rilevamento affinché possa essere registrato e, in fine, rappresentazione del risultato, delle precedenti operazioni, in maniera idonea. Data la varietà di discipline coinvolte nello studio dei sensori, sono state adottate numerose definizioni di tali dispositivi ma quella che meglio si adatta all'ambito di questo lavoro di dottorato definisce un sensore come un dispositivo in grado di fornire un segnale in uscita (output) come risposta a uno specifico segnale in entrata (input). Il segnale in uscita è sempre di tipo elettrico mentre quello in entrata può essere di qualunque quantità, proprietà o condizione chimico-fisica. Secondo quest'accezione il sensore può anche essere chiamato trasduttore.

Il successo industriale di un sensore dipende dal suo grado d'inserimento nella realtà produttiva. Se si considera il livello d'innovazione dei processi industriali, della produttività e della precisione, la richiesta di risparmio energetico e di materiali ecocompatibili, segue necessariamente che le proprietà richieste a un sensore sono:

- Compatibilità con la microelettronica
- Affidabilità e sicurezza a livello operativo
- Manutenzione ridotta
- Elevata sensibilità
- Elevata riproducibilità dei dati
- Miniaturizzazione
- Bassi costi a livello di produzione di massa
- Robustezza nei confronti di sollecitazioni meccaniche, chimiche ed elettriche
- Stabilità a lungo termine.

I componenti alla base di un sensore elettrochimico sono costituiti da un elettrodo di lavoro (working), un controelettrodo (counter) e un elettrodo di riferimento (reference) che consente di misurare la differenza di potenziale applicata tra



l'elettrodo di lavoro e il contro elettrodo. Questi sono immersi in un elettrolita di supporto che può essere liquido o solido e che ha il compito di sostenere la corrente. Quando avviene una reazione redox, si ha un flusso di elettroni tra l'elettrodo di lavoro e il contro elettrodo che viene immesso nel circuito elettrico esterno e misurato poiché è proporzionale alla concentrazione della specie che si è ossidata o ridotta secondo l'equazione di Nernst.

## 1.2 I biosensori

Il primo dispositivo biosensoristico fu creato integrando una molecola biologica reattiva nella superficie elettrodica [8] del sensore e dal quel momento in poi molti progressi sono stati fatti nella diagnostica clinica basata sul dosaggio di diversi metaboliti (come ad esempio il glucosio, gli ormoni, i neurotrasmettitori, gli anticorpi e gli antigeni). Un biosensore è un dispositivo elettroanalitico composto da un sistema biologico reattivo in intimo contatto con un trasduttore di tipo fisico [9, 10] per mezzo di un opportuno materiale (ad esempio un polimero) così che la risposta biochimica sia convertita in un segnale elettrico quantificabile e processabile.

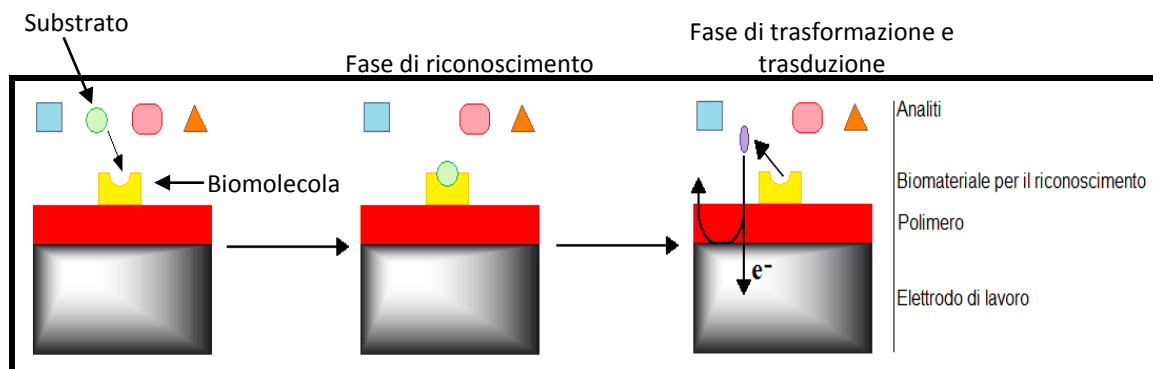


Figura 2. Generale schema di un dispositivo biosensoristico elettrochimico.

Specifiche interazioni tra il bersaglio chimico e il biorecettore producono una variazione di una grandezza chimico-fisica che è rivelata e misurata dal trasduttore. Quest'ultimo è un convertitore di energia che fornisce informazioni analitiche quantitative o semiquantitative.

Un biosensore, o anche semplicemente un sensore, con qualsiasi tipo di trasduttore, per essere vantaggioso rispetto ai sistemi classici di analisi, deve possedere alcuni requisiti fondamentali:

1. un segnale in uscita riproducibile e preciso con una sensibilità e risoluzione adeguata per l'analita in esame.
2. una risposta lineare del trasduttore rispetto alla concentrazione di analita testata ed è necessario, inoltre che tale linearità si mantenga costante per tutto l'intervallo di concentrazione che può essere oggetto di indagine.
3. un'indipendenza sia alle variazioni termiche sia ad altre sostanze contemporaneamente presenti, una robustezza meccanica e non deve necessitare di frequenti calibrazioni o interventi tecnici.
4. economicità, praticità e di dimensioni contenute.
5. un volume di campione ridotto ( $\mu\text{l}$ ).

In ingegneria, un "biosensore" [11, 12] è definito come un dispositivo analitico che comprende un elemento sensoriale biologico o biologicamente derivato e integrato (o connesso intimamente) con un trasduttore chimico-fisico che sia in grado di inviare un segnale processabile e quantificabile a un'interfaccia grafica poiché lo scopo di tale dispositivo è di ottenere valori numerici discreti o continui che siano proporzionali a un singolo analita o a un gruppo di analiti correlabili tra loro da caratteristiche comuni (come ad esempio la struttura chimica, l'acidità o l'emissione cromatica). Di conseguenza, è chiaro che il meccanismo biologico di riconoscimento è principalmente connesso con il rilevamento chimico [13].

Il biosensore più ben noto e, probabilmente, il più vantaggioso è quello portatile per la determinazione del glucosio nel sangue usato da molti pazienti affetti da diabete per monitoraggio "fai-da-te" di tale metabolita.

Questo sensore usa un enzima (la glucosio ossidasi, GOD) immobilizzato su un elettrodo, di platino, di oro o di grafite, opportunamente ingegnerizzato. Per la determinazione di altri substrati è possibile usare altre biomolecole, quale anticorpi, acidi nucleici (DNA e RNA) o persino un intero



microorganismo come batteri geneticamente modificati ad esempio con il gene *lux* che permette di emettere luce in risposta a sostanze inquinanti [12].

Lo sviluppo del campo della biosensoristica ha creato le fondamenta per l'uso dei polimeri in diverse applicazioni biomediche come ad esempio la progettazione di tessuti biologici artificiali in quanto, tali materiali, sono dotati di adeguata attività elettrica (fondamentale, ad esempio, per permettere l'interazione con cellule elettroattive come neuroni, fibroblasti e osteoblasti) hanno buona reversibilità e stabilità redox che ne consentono un duraturo funzionamento a contatto con i fluidi biologici ricchi di agenti ossidanti e riducenti, hanno una buona biocompatibilità poiché la loro struttura mima quella di numerosi altri polimeri naturali come proteine e collagene e hanno una buona idrofobicità con un angolo di contatto dell'acqua pari a 40°-70° tale da permettere l'adesione cellulare e impedire l'emoagglutinazione.

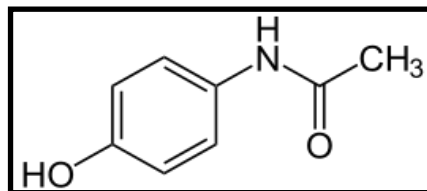
## Capitolo 2: Analiti di interesse biologico e patologie

Molti analiti partecipano all'economia dell'organismo, svolgendo un ruolo importante sia in condizioni fisiologiche sia nella genesi e nel decorso di varie patologie: è facile, quindi, comprendere l'interesse e gli sforzi dei ricercatori nel progettare sistemi di rivelazione analitica sempre più efficienti e affidabili.

### 2.1 Analiti studiati in questo lavoro

In questo lavoro di tesi sono state prese in esame le seguenti molecole d'interesse biologico:

**Acetamminofene:** detto anche **paracetamolo** (o para-acetamminofenolo) [14] è un farmaco analgesico e antipiretico con scarsa azione, la cui inclusione nella classe degli antinfiammatori non



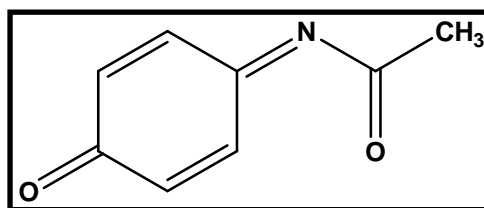
steroidi (FANS) dipende dalla dimostrazione (nel 2005 ed ancora in corso) della sua azione antiprostaglandinica. A differenza dei FANS, quindi, non presenta gastrolesività e nefrotossicità. Il paracetamolo è ben conosciuto in altri paesi, soprattutto di cultura anglosassone, a causa della sua diffusione come farmaco generico. In Italia, al contrario, il nome della sostanza è poco conosciuto, mentre sono ben noti i nomi commerciali dei farmaci che lo contengono (*Tachipirina*, *Effergal*, ecc.).

Si pensa [15] che l'azione antinfiammatoria sia attribuibile a una inibizione debole della via di sintesi delle prostaglandine, responsabili del processo infiammatorio, e sintetizzate per azione di due enzimi detti cicloossigenasi (COX1 e COX2) sull'acido arachidonico. In vivo – cioè quando la concentrazione di quest'ultimo è bassa (<5 µmol/L) – la produzione di prostaglandine è determinata in maggior parte dalla COX2 e in minor parte dalla COX1. In condizioni fisiologiche e a dosi terapeutiche, il paracetamolo esercita una debole azione inibitoria sulla COX2 inibendo in parte la cascata di reazioni che dall'acido arachidonico portano alla formazione delle prostaciline, determinando, in tal modo, a un blando effetto antiinfiammatorio in vivo.

Al di fuori dell'inibizione della COX2, sembra che esista una terza isoforma di ciclo-ossigenasi espressa a livello cerebrale (COX3) che potrebbe essere il bersaglio preferenziale del paracetamolo e di altri antipiretici. L'inibizione di questo enzima, che è stato dimostrato essere una variante molecolare della COX1, potrebbe dar conto di una parte degli effetti analgesici e antifebbrili centrali mediati dal paracetamolo nell'uomo, dato che nel ratto non sembrano essere importanti.

Un rischio correlato con il suo utilizzo è rappresentato dalla sua presenza in diversi medicinali, sia come unica sostanza sia in associazione, e ciò conduce spesso al sovradosaggio. Dosi superiori a quattro grammi di sostanza al giorno (riferito ad un adulto del peso di 80 kg o più) sono considerate pericolose per la salute, con una tossicità che si rivolge verso il fegato con effetti potenzialmente fatali. Una dose di 10 - 15 grammi è letale, in quanto porta a un'epatite fulminante (in relazione alla suscettibilità del singolo soggetto anche quantità inferiori di 7 - 8 grammi possono essere fatali).

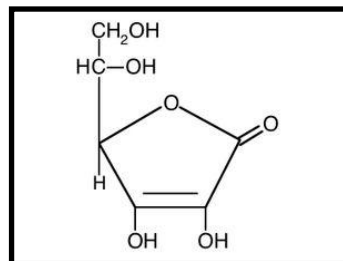
Il paracetamolo viene metabolizzato dalle cellule della zona 3 dell'acino epatico. In queste cellule c'è una concentrazione elevata di citocromo P450, il quale trasforma il paracetamolo in **N-acetilbenzochinonimmina**, un composto molto reattivo e tossico, che colpisce soprattutto le proteine epatiche.



La tossicità della N-acetilbenzochinonimmina, è strettamente correlata alla presenza sull'anello aromatico di due doppi legami: uno con l'azoto e l'altro con l'ossigeno. Anche le cellule della zona 1 dell'acino epatico potrebbero coniugare il paracetamolo con glutathione (GSH) e formare un glutathione-coniugato, facilmente eliminabile, ma, poiché la concentrazione di glutathione nelle cellule della zona 1 è bassa, agisce principalmente il citocromo P450 della zona 3. In generale la tossicità di questa sostanza è legata al limitato potere detossificante del GSH; in caso di ingestione eccessiva, il paracetamolo porta necrosi delle cellule epatiche in 3-5 giorni. Nel caso di avvelenamento da sovradosaggio, esiste la potenziale nefrotossicità del paracetamolo, poiché l'escrezione di questa molecola è interamente a carico dei reni dove, in caso di sovradosaggio, lo ritroviamo anche non metabolizzato. Ma occorre precisare che attualmente è il farmaco meno nefrotossico tra quelli utilizzabili per il dolore e i traumi

ed è per tale motivo notoriamente considerato di prima scelta nelle persone affette da problemi renali che non possono fare uso dei classici FANS.

**Acido Ascorbico:** L'acido ascorbico esiste in due forme enantiomere (immagini speculari non sovrapponibili tra loro) ma solo una di esse, l'enantiomero (5R)-5-[(1S)-1,2-diidrossietil]-3,4-diidrossifurano-2(5H)-one (l'enantiomero L), è la vitamina C. È un composto molto idrosolubile,



spiccatamente acido, che si presenta sotto forma di cristalli inodori ed insapori con pH circa 2.5 e rotazione ottica specifica di circa +20 gradi. La vitamina C assunta con la dieta viene assorbita a partire dalla bocca, nello stomaco e soprattutto a livello dell'intestino tenue grazie ad un processo di diffusione passiva dipendente dal sodio. Questo sistema è molto efficiente soprattutto per basse dosi della vitamina. Via via che la concentrazione di acido ascorbico cresce, il sistema di assorbimento si riduce di efficienza fino a valori del 16%. Nel plasma la vitamina circola per il 90-95% come acido ascorbico e nel 5-10% come acido deidroascorbico. La vitamina C viene immagazzinata nei tessuti dell'organismo, in particolare, nel surrene e nel fegato. La quota plasmatica che non viene immagazzinata viene eliminata con le urine. La vitamina C possiede una forte azione riducente a seguito della presenza di un gruppo enediolico. In presenza di ossigeno e metalli, l'acido ascorbico tende ad ossidarsi ed a formare acido deidroascorbico ed acqua ossigenata. Grazie alla forte azione riducente, la vitamina C è utilizzata in molte reazioni di ossidoriduzione. In particolare la vitamina è in grado di donare un elettrone, formando così l'acido semideidroascorbico il quale può donare un secondo elettrone, generando così l'acido deidroascorbico. I potenziali redox di tali reazioni sono:

- acido semiidroascorbico/acido ascorbico: 0,28 Volt,
- acido deidroascorbico/acido semiidroascorbico: -0,17 Volt.

Ciò fa della vitamina C un valido donatore di elettroni. Il prodotto finale delle reazioni descritte, l'acido deidroascorbico, può venir ridotto ad opera di un enzima dipendente dal glutathione (GSH), la deidroascorbato reduttasi, rigenerando, così, l'acido ascorbico. La spiccata azione antiossidante della vitamina C e la sua capacità di mantenere stabili le vitamine A, E, l'acido folico e la tiamina, viene sfruttata dalle industrie che la usano (come tale o sotto forma di sale sodico, potassico e calcico) come additivo nei cibi.

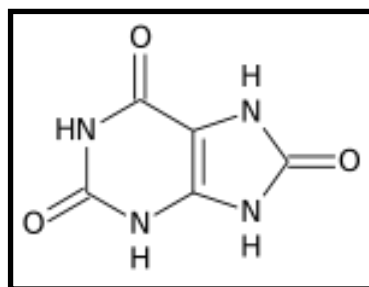
La vitamina C è importante per il corretto funzionamento del sistema immunitario [16] e la sintesi di collagene nell'organismo. Il collagene rinforza i vasi sanguigni, la pelle, i muscoli e le ossa. L'uomo non può creare collagene senza la vitamina C.

Sembra che la vitamina C abbia un ruolo importante, soprattutto in reazioni di ossidoriduzione catalizzate da ossigenasi, e svolga un'azione antistaminica. Tra i processi più noti in cui la vitamina dovrebbe intervenire si ricordano:

- idrossilazione della lisina e della prolina ad opera della prolina idrossilasi e della lisina idrossilasi, reazioni importanti per la maturazione del collagene
- idrossilazione della dopamina per formare la noradrenalina
- sintesi della carnitina, fondamentale per la trasformazione degli alimenti, assunti con la dieta, in energia
- catabolismo della tirosina
- amidazione di alcuni peptidi con azione ormonale
- sintesi degli acidi biliari
- sintesi degli ormoni steroidei per intervento durante le reazioni di idrossilazione
- riduzione dell'acido folico per formare la forma coenzimatica
- aumento dell'assorbimento di ferro per riduzione del Fe (III) a Fe (II)
- azione di rigenerazione della vitamina E per cessione di un elettrone al radicale  $\alpha$ -tocoferossilico.

Sembra, inoltre, che la vitamina C possa diminuire la formazione di nitrosamine intestinali e ridurre vari composti ossidanti [17-20] (il radicale superossido, l'acido ipocloroso e i radicali idrossilici) potenzialmente cancerogenici per l'organismo.

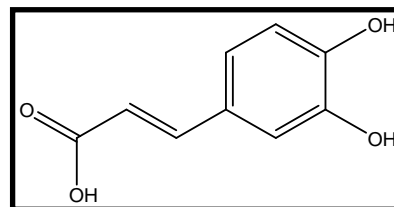
**Acido urico:** è il prodotto della degradazione delle purine esogene ed endogene e in condizioni fisiologiche viene eliminato dal rene nelle urine. Tipica malattia riferibile all'aumento del tasso uricemico (iperuricemia con livelli nel sangue superiori a 0.38mmol/l che corrispondono a



6.4mg/dl) è la gotta [21], conseguente alla precipitazione di cristalli di acido urico nelle articolazioni e nel tessuto connettivo. Tra i tessuti in cui i cristalli tendono ad accumularsi, vi sono quelli avascolari (ad esempio le cartilagini), quelli poco vascolarizzati (come tendini e legamenti) [22, 23] e quelli che si trovano intorno alle articolazioni periferiche distali o ai tessuti più freddi (per es. l'orecchio). Il deposito di

acido urico nelle articolazioni porta al loro deterioramento, con conseguente comparsa di osteoartrite e altre malattie osteoarticolari. Arrivando nell'urina, l'acido urico può precipitare creando delle piccole formazioni di cristallo che, nel tempo, possono aggregarsi per formare dei granelli o dei calcoli e portare a calcolosi.

**Acido caffeico:** sostanza di natura polifenolica (chimicamente è l'acido 3,4-diidrossicinnamico) dalle proprietà antiossidanti, dimostrate sia in vivo sia in vitro, grazie al fatto che ha due funzioni ossidriliche



vicinali che sono in grado di formare un radicale chinonico molto stabile. Quest'ultimo reagisce con i radicali liberi che si possono formare nell'ambiente a seguito di reazioni di ossidazione.

Il vino è una delle bevande più ricche di composti polifenolici [24] per cui ha un determinato potere antiossidante in funzione della quantità di tali composti in esso presenti. L'acido caffeico è uno dei più comuni acidi idrossicinnamici presenti in tale bevanda; questo può essere presente anche nel mosto sotto forma di acido caftarico il quale viene idrolizzato ad acido caffeico e acido tartarico per azione metabolica del lievito durante la fermentazione. La velocità di questa trasformazione è variabile e dipende dal pH del vino e dalla presenza dell'enzima *idrossicinnamato esterasi*. Il contenuto di acido caffeico nel vino bianco può essere fino a  $70\text{mg l}^{-1}$  (circa  $0.39\text{mmol l}^{-1}$ ) [25-27] con valori ancora più alti per il vino rosso. Alcuni studi hanno investigato i possibili effetti neuroprotettivi dell'acido caffeico, che consistono nella possibilità che tale composto inibisca la formazione di placche di  $\beta$ -amiloide, ritenuta una delle principali cause del morbo di Alzheimer [28].

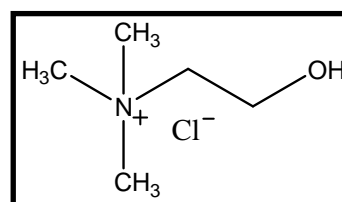
Oltre agli effetti antiossidanti e antimutageni, l'acido caffeico e i suoi derivati godono anche di proprietà antinfiammatorie, che sono dovute alla loro capacità di inibire le COX1 e COX2 ed altri enzimi chiave coinvolti nel processo infiammatorio. Recenti studi hanno dimostrato che l'acido caffeico ha proprietà immunomodulanti e alcuni suoi derivati hanno dimostrato di essere potenti inibitori di una variante dell'enzima integrasi del virus dell'immunodeficienza umana (tipo 1) [29,30]. Come conseguenza, sono stati condotti studi per lo sviluppo di metodologie analitiche per la determinazione dell'acido caffeico e dei suoi derivati presenti nei vegetali e nelle bevande naturali e industriali [31-33].



Diversi metodi elettrochimici hanno dato buoni risultati nella determinazione dell'acido caffeico e dei suoi derivati, sia in termini di sensibilità sia di sensitività [34-36] ma questo lavoro si propone di determinare questo analita sia in tracce (quantità nell'ordine delle picomoli) che su valori più alti di concentrazioni e tipici delle più comuni bevande, come ad esempio il vino.

Dal momento che i radicali liberi partecipano allo sviluppo di malattie croniche importanti, come quelle cardiovascolari e il cancro, il consumo di alimenti o integratori ricchi in acido caffeico e in altri composti fenolici esplica potenzialmente un ruolo protettivo nei confronti di queste patologie.

**Colina:** indispensabile per la sintesi dell'acetilcolina (importante neurotrasmettitore implicato nel controllo muscolare e della memoria) e dei principali componenti delle membrane cellulari: fosfatidilcolina (lecitina) e



sfingomielina (forma la guaina isolante che protegge gli assoni e dendriti neuronali ed è quindi alla base della conduzione del segnale elettrico nel sistema nervoso). E' necessaria anche per il corretto metabolismo lipidico: la bile infatti produce degli acidi che si uniscono alla colina e alla taurina per formare i sali biliari, che rendono i grassi solubili, per permettere la loro digestione. Senza colina praticamente i grassi rimangono intrappolati nel fegato, bloccando le reazioni metaboliche. In alcuni studi è stato osservato che la deficienza di colina incrementa la sensibilità del fegato di ratto a carcinogeni epatocellulari di varia struttura e potenza; una severa deficienza può provocare cirrosi micronodulare e aumentata induzione di tumori. Gli effetti della deficienza di colina sono in parte mediati dalla modulazione di enzimi microsomiali e probabilmente citosolici responsabili dell'attivazione/disattivazione di carcinogeni [37].

**Perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):** questa sostanza (nota anche come acqua ossigenata) è un intermedio di reazione molto importante sia dal punto di vista biologico che ambientale. È largamente diffusa in molti campi, incluso quello dell'inquinamento, quello tessile e non ultimo quello della sterilizzazione [38,39]. Questa molecola è il prodotto finale di una serie di enzimi molto abbondanti nel regno animale, detti ossidasi, i quali la producono a seguito della reazione sul loro specifico substrato. È considerata insieme ai radicali liberi dell'ossigeno, all'acido ipocloroso e all'anione

perossinitrico, una specie ossigenata reattiva (ROS) [40]. Solo gli antiossidanti riescono a bloccare l'attività di queste specie chimiche molto reattive alle quali appartiene il perossido di idrogeno. Per questo motivo,  $H_2O_2$  è coinvolta in molti processi di invecchiamento cellulare e deterioramento strutturale a causa del suo alto potere ossidante.

**Glucosio:** è un monosaccaride aldeidico; è il composto organico più diffuso in natura, sia libero sia sotto forma di polimeri (oligosaccaridi e polisaccaridi).

È una molecola chirale ma l'enantiomero destrogiro (D-glucosio o destrosio) è il più diffuso in natura poiché presente allo stato libero in numerosi frutti zuccherini; si trova anche nella maggior parte dei liquidi organici, nel fegato, nel sangue e nella milza. Il nome *destrosio* è dovuto al fatto che una soluzione di D-glucosio ruota il piano della luce polarizzata verso destra (senso orario).

È uno dei carboidrati più importanti ed è usato come fonte di energia sia dagli animali che dalle piante. Il glucosio è il principale prodotto della fotosintesi (detto ciclo di CAM) ed è il combustibile della respirazione cellulare (detto ciclo di KREBS).

Si scioglie bene in acqua (470 g/l) e poco in etanolo. Una soluzione di 100 g/l in acqua a 20 °C ha pH circa 7.

Il glucosio è uno zucchero *aldoesoso* perché la sua molecola contiene un gruppo -CHO, tipico delle aldeidi (*aldo-*) e perché è composta da sei atomi di carbonio (*-esoso*). La sua forma più stabile è quella in cui uno dei gruppi ossidrilici si lega al carbonio del gruppo aldeidico (C=O) a formare un anello a 6 atomi, un *anello piranosico*, la cui struttura è riportata in figura 3. La reazione di formazione dell'anello è reversibile; a pH 7 circa lo 0,0026% delle molecole è presente in forma aperta. Quando la molecola del glucosio si chiude ad anello, può farlo in due modi diversi; il gruppo -OH legato all'atomo di carbonio immediatamente successivo a quello di ossigeno percorrendo l'anello in senso orario può infatti puntare verso il basso o verso l'alto rispetto al piano medio della molecola, nel primo caso si parla di forma  $\alpha$ , nel secondo di forma  $\beta$ . In soluzione acquosa le due forme si convertono l'una nell'altra (*mutorotazione*) e nel giro di qualche ora le proporzioni si stabilizzano sul rapporto  $\alpha:\beta$  come 36:64.

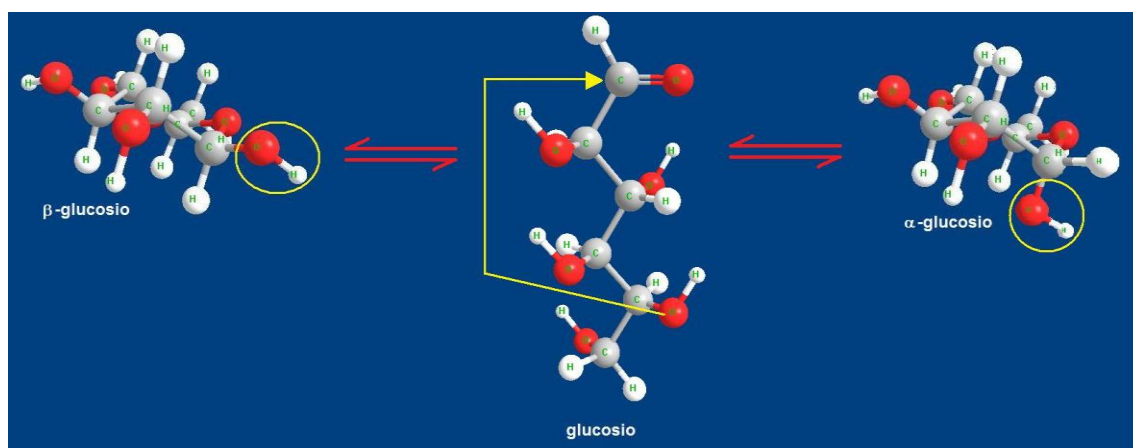


Figura 3. Meccanismo di mutarotazione del glucosio in soluzione acquosa

Un'altra proprietà, forse più importante per le forme di vita superiori, è la sua ridotta (rispetto ad altri zuccheri esosi) tendenza a reagire con i gruppi amminici delle proteine. Questa reazione (detta *glicosilazione*) riduce o annulla l'attività di molti enzimi ed è responsabile di numerosi effetti a lungo termine del diabete, quali la cecità e la ridotta funzione renale. La bassa reattività del glucosio verso la glicosilazione è dovuta al suo prevalente permanere nella forma ciclica, meno reattiva.

Nella respirazione, attraverso una serie di reazioni catalizzate da enzimi, il glucosio viene ossidato fino a formare biossido di carbonio e acqua; l'energia prodotta da questa reazione viene usata per produrre molecole di adenosintrifosfato (ATP).

Una molecola di glucosio ed una di fruttosio unite da un legame glicosidico formano una molecola di saccarosio, il comune zucchero da tavola. L'amido, la cellulosa ed il glicogeno sono polimeri del glucosio e vengono generalmente classificati come *polisaccaridi*.

Nei sistemi viventi

- è il prodotto della fotosintesi nelle piante ed in alcuni procarioti
- viene prodotto nel fegato per scissione delle riserve di glicogeno
- viene prodotto nel fegato e dalla surrene tramite un processo noto come *gluconeogenesi*

I carboidrati sono una fonte di energia molto importante per gli organismi viventi; la loro combustione attraverso la respirazione fornisce circa 4 calorie per grammo.

Attraverso la *glicolisi*, il glucosio è immediatamente coinvolto nella produzione dell'adenosin-trifosfato (ATP), che è il vettore energetico delle cellule. È altresì un

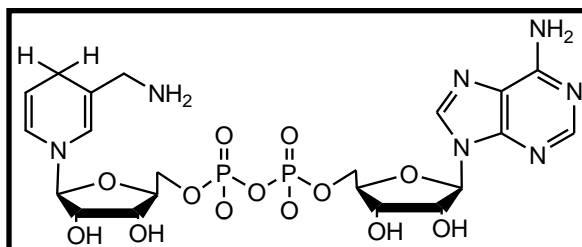
composto critico nella sintesi delle proteine e nel metabolismo dei lipidi. Inoltre, dato che le cellule del sistema nervoso non sono in grado di metabolizzare i lipidi, il glucosio rappresenta la loro fonte principale di energia.

Il glucosio è assorbito nel sangue attraverso le pareti intestinali. Parte di esso viene indirizzato direttamente alle cellule cerebrali, mentre il rimanente si accumula nei tessuti del fegato e dei muscoli in una forma polimerica affine all'amido, il glicogeno. Quest'ultimo è una fonte di energia ausiliaria per il corpo e funge da riserva che viene consumata quando è necessario (ad esempio, durante il digiuno notturno).

Proprio il rapido assorbimento del glucosio ne fa uno degli zuccheri semplici a più alto indice glicemico, tanto che viene internazionalmente utilizzato come unità di misura di tale indice, e posto a 100.

La più importante malattia correlata con il glucosio è il diabete. Questa è una malattia cronica caratterizzata dalla presenza di elevati livelli di glucosio nel sangue (iperglicemia) e dovuta a un'alterata quantità o funzione dell'insulina. L'insulina è l'ormone, prodotto dal pancreas, che consente al glucosio l'ingresso nelle cellule e il suo conseguente utilizzo come fonte energetica. Quando questo meccanismo è alterato, il glucosio si accumula nel circolo sanguigno provocando uno stato morboso caratterizzato da glicemia, poliuria, dispepsia, etc.

**NADH:** il nicotinammide adenin dinucleotide (a cui ci si riferisce spesso con la formula NAD o NADH a seconda dello stato di ossidazione) è un importante coenzima ossidoriduttivo



che svolge, in tutte le cellule, una fondamentale azione antiossidante contrastando i danni causati dai radicali liberi, ma è deputato soprattutto alla produzione di energia biochimica.

Numerose ricerche hanno dimostrato che, assunto come supplemento alimentare, il NADH può agire in modo rilevante sul sistema nervoso centrale, incrementando la produzione di neurotrasmettitori quali acetilcolina, dopamina e noradrenalina: questo comporta una stimolazione delle funzioni intellettive più elevate, fra cui l'apprendimento, la capacità di concentrazione e la memoria. Può risultare utile nella sindrome da stanchezza cronica in quanto, oltre ad incrementare la sintesi di ATP,

migliora l'efficienza del sistema immunitario: essendo infatti il principale agente riducente cellulare, incrementa i livelli di tutti gli antiossidanti endogeni, contrastando così il danno ossidativo.

## Neurotrasmettitori

I neurotrasmettitori sono sostanze chimiche rilasciate dai neuroni a livello intersinaptico, in seguito ad un impulso nervoso, nel fluido extracellulare cerebrale, e giocano importanti ruoli in vari processi biologici e farmacologici [41] comportandosi da “messaggeri” deputati al trasferimento di informazioni tra un neurone e l’altro [42]. Per entrare nel novero dei neurotrasmettitori i messaggeri chimici devono soddisfare quattro criteri [43]:

1. essere biosintetizzati in un sito adiacente a quello del rilascio
2. essere depositati in vescicole sinaptiche nel sito di rilascio
3. essere rilasciati per esocitosi nello spazio intersinaptico in risposta ad uno stimolo preciso
4. legarsi a uno specifico recettore su un neurone bersaglio.

In base alla capacità di suscitare o inibire la formazione di un potenziale d’azione, e quindi la propagazione dell’impulso nervoso, vengono rispettivamente distinti in eccitatori e inibitori. In base alle caratteristiche strutturali, vengono fatti rientrare in quattro principali gruppi:

- i. Neurotrasmettitori di natura acida, come ad esempio l’acido gamma-aminobutirrico (GABA) e l’acido glutammico; sono quelli dotati di struttura più semplice.
- ii. Amine biogene: a questo gruppo appartengono le catecolamine (dopamina, epinefrina, norepinefrina), istamina e serotonina. Hanno una concentrazione cerebrale piuttosto bassa rispetto ai neurotrasmettitori del primo tipo, ma svolgono ugualmente un ruolo molto importante; infatti tali sostanze sono coinvolte in maniera più o meno diretta nel controllo della coordinazione motoria, delle manifestazioni comportamentali, dei processi cognitivi e soprattutto delle emozioni. L’azione delle amine biogene si esplica in maniera più lenta e meno marcata rispetto a quella dei neurotrasmettitori del primo tipo, ma tende a essere più persistente.
- iii. Neuropeptidi: comprendono encefaline, endorfine, sostanza P, neurotensina e molti altri. Si tratta di complesse molecole proteiche costituite da catene di lunghezza variabile, e possono essere rilasciati sia dai neuroni sia dalle cellule neurosecretrici localizzate in tessuti e organi non nervosi, come intestino, cuore, pancreas. Queste molecole sono dette, più propriamente, “neuromediatori” o “neuromodulatori”,

perché possono passare direttamente attraverso lo spazio sinaptico, ma sono anche in grado di diffondere a distanze maggiori, influenzando per esempio numerose cellule all'interno di una certa zona del sistema nervoso centrale (SNC).

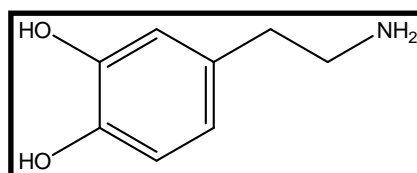
iv. Neurotrasmettitori gassosi: in diverse aree del sistema nervoso è stata rilevata la presenza di enzimi che catalizzano la produzione di ossido nitrico e di monossido di carbonio. A causa della loro natura gassosa queste sostanze possono diffondere a distanza, inoltre non hanno bisogno di recettori di membrana per penetrare all'interno delle cellule.

L'interazione tra neurotrasmettitore e recettore è uno dei modi principali in cui i neuroni comunicano. La comprensione di come da questa comunicazione intercellulare scaturisca una coordinazione all'interno dei sistemi biologici, è sempre stata un importante target della ricerca biologica per quanto riguarda la rilevazione delle loro concentrazioni, insieme alla determinazione del sito e dell'andamento del loro rilascio. Sapendo infatti dove, come e quando le sostanze sono rilasciate, si può capire come funziona un sistema organico e perché può "venir meno" in condizioni patologiche [44].

I neuroscienziati, i chimici e gli ingegneri stanno progettando vari strumenti e metodi per studiare i fenomeni associati alla neurotrasmissione [45]; questo perché anomalie di sintesi, immagazzinamento, rilascio e degradazione dei neurotrasmettitori, oppure alterazioni del numero e dell'affinità dei recettori, compromettono la neurotrasmissione e sono responsabili di patologie cliniche. Accurate e specifiche misurazioni dei neurotrasmettitori e dei neuromodulatori in campioni biologici sono spesso indispensabili per la diagnosi clinica e la terapia di vari disturbi neuropsichiatrici e neurodegenerativi, come il morbo di Alzheimer, la sindrome di Down, la sclerosi multipla, il morbo di Parkinson e la schizofrenia [41].

Tra i neurotrasmettitori maggiormente implicati nei fenomeni patologici e più studiati in tal senso, se ne possono annoverare alcuni facenti parte del gruppo delle amine biogene.

La **dopamina** (DA) è un'amina biogena naturalmente sintetizzata dal corpo umano; appartiene alla classe delle "catecolamine", sostanze farmacologicamente



attive così chiamate perché contengono nella propria struttura sia un gruppo aminico sia un orto-diidrossi-benzenico, il cui nome chimico è "catecolo". All'interno del

cervello funziona da neurotrasmettitore, modulando molti aspetti del sistema di circuiti cerebrali tramite l'attivazione di recettori specifici. Essa è anche un neuroormone rilasciato dall'ipotalamo, la cui principale funzione è di inibire il rilascio di prolattina da parte del lobo anteriore dell'ipofisi.

La DA è particolarmente importante nel funzionamento dei sistemi nervoso, renale, ormonale e cardiovascolare. E' implicata, tra l'altro, nel processo di produzione delle endorfine, sostanze regolatrici del senso del dolore, e nella regolazione del piacere [46].

I neuroni dopaminergici mesencefalici rappresentano la più importante fonte di dopamina nel cervello e controllano funzioni fondamentali quali la gratificazione e l'attività motoria.

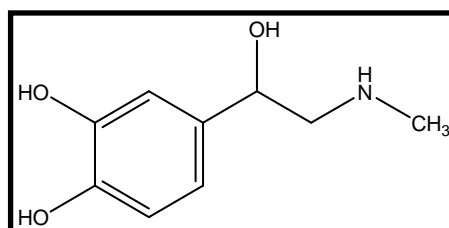
La disfunzione del sistema dopaminergico nel sistema nervoso centrale è stata correlata a disordini neurologici di varia natura, primo tra tutti il morbo di Parkinson, la cui caratteristica neuropatologica è rappresentata dalla neurodegenerazione e progressiva perdita dei neuroni dopaminergici nigrostriatali [47].

Il quadro clinico della malattia è caratterizzato da tremore a riposo, incapacità di cominciare o completare movimenti, rigidità muscolare, instabilità posturale, inespressività facciale [48].

Dal momento che tale morbo è caratterizzato da una severa deplezione del pool dopaminergico in vivo, la capacità di misurare in maniera selettiva e sensibile la concentrazione della dopamina potrebbe potenzialmente essere usata per diagnosticarlo. Difetti nei percorsi dopaminergici sono associati anche ad altri disturbi, quali la schizofrenia, il morbo di Huntington [49], l'ADHD (disturbo da deficit dell'attenzione con iperattività che può manifestarsi già nella prima infanzia), la tossicodipendenza in quanto molte droghe d'abuso hanno come bersaglio il sistema dopaminergico [50].

Inoltre ricerche neurobiologiche hanno suggerito che disfunzioni del sistema dopaminergico rivestono un ruolo critico in alcune manifestazioni cliniche dell'infezione da HIV [51].

L'**epinefrina**, o adrenalina, fa parte anch'essa del gruppo delle catecolamine. A livello fisiologico è sia un ormone (prodotto dalla midollare del



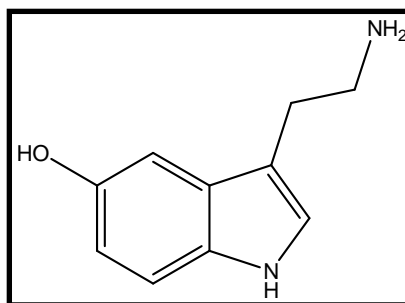


surrene) che un neurotrasmettitore, dalle proprietà vasocostrittive e stimolanti cardiache.

Solitamente è presente nel sangue solo in quantità minime, che aumentano in momenti di particolare ansia, eccitazione o stress emotivo, dal momento che essa ha un'azione generale stimolante sulle strutture corporee, preparandole a sforzi psicofisici. Tra i suoi effetti, la stimolazione del cuore, la costrizione dei piccoli vasi sanguigni, l'innalzamento della pressione sanguigna, la liberazione del glucosio per glicogenolisi nel fegato e il rilassamento o la contrazione di alcuni muscoli involontari. E' largamente usata come farmaco in caso di shock, di collasso cardiocircolatorio e di asma, per la sua azione broncodilatatoria e antiallergica. In caso di sovradosaggi, gli effetti tossici dell'epinefrina sono palpitazioni, tremori, attacchi anginosi, aritmie, fino alla fibrillazione.

Molti studi sono condotti anche sul precursore delle catecolamine, il **catecolo**, allo scopo di sviluppare un metodo analitico sensibile per la sua determinazione, importante per il monitoraggio ambientale e per la salute umana. Anche piccole quantità di catecolo nei cibi e nel fumo di sigaretta, infatti, possono provocare mutagenesi e alterazioni cancerose. Inoltre, l'assorbimento del catecolo dal tratto gastrointestinale può portare ad alcuni disturbi, come la degenerazione dei tubuli renali e la diminuzione della funzionalità epatica [52].

La **serotonina** (5-HT) è un neurotrasmettitore monoaminico sintetizzato in neuroni specializzati del sistema nervoso centrale, detti appunto serotonergici, nonché nelle cellule enterocromaffini dell'apparato gastrointestinale; le più alte concentrazioni di 5-HT si trovano principalmente in



tre siti corporei: il sistema nervoso centrale, il sangue e la parete intestinale.

Essa sembra implicata nella regolazione del sonno e dell'attività onirica, nel controllo della temperatura corporea e nella coordinazione delle attività intestinali. Nel sistema cardiovascolare agisce sulla contrazione delle arterie, contribuendo al controllo della pressione sanguigna; nei muscoli scheletrici dilata i vasi e migliora la vascolarizzazione. L'ampio uso di inibitori del ricaptazione della serotonina e di agonisti del suo recettore, ha suggerito un ruolo chiave per il neurotrasmettitore nell'ansia, ruolo che, tuttavia,

non è stato ancora completamente chiarito. Dati vari, e a volte contrastanti, derivanti da studi condotti sull'uomo e sull'animale dimostrano sia un ruolo ansiolitico sia ansiogenico, a seconda del disturbo specifico o aspetto comportamentale studiati. Ad ogni modo, studi della funzione serotonergica in pazienti con disturbi ansiosi suggeriscono, anche se non in modo definitivo, la presenza di anomalie in tale funzione [53].

Negli ultimi anni è stato chiarito il fatto che il neurotrasmettitore riveste un ruolo chiave anche nella genesi della depressione: una mancanza di serotonina può causare infatti depressioni, stati di ansia e di aggressività. Anche lo stress, la tossicomania, il sovrappeso, gli attacchi di emicrania, la sindrome premestruale e i pensieri suicidi sono spesso associati a bassi livelli di serotonina. Altra malattia con molte probabilità connessa alla mancanza di serotonina è la fibromialgia, una sindrome complessa, contrassegnata da forti dolori muscolari, affaticamento, febbre, insonnia, sintomi di colon irritabile e linfonodi ingrossati, che colpisce più frequentemente le donne. Molti farmaci, quali gli anoressizzanti, gli anticolsterolemici e alcune diete, inibiscono la formazione di serotonina e possono scatenare i sintomi caratteristici di uno stato carenziale del neurotrasmettitore.

Avendo poi una struttura chimica simile a quella dell'LSD, dietilammide dell'acido lisergico, (una droga dotata di attività allucinogene e psichedeliche), alcuni neuroscienziati hanno ipotizzato un coinvolgimento del neurotrasmettitore negli stati di coscienza alterati indotti dalle sostanze psichedeliche e nella sintomatologia allucinatoria propria della schizofrenia. È stata inoltre messa in luce l'influenza della 5-HT sul comportamento motorio: quando l'1-triptofano (1-TP), l'aminoacido precursore della sintesi del neurotrasmettitore è sistemicamente somministrato ai mammiferi, si verifica una sindrome motoria, che consiste in tremori, rigidità, abduzioni, ecc. Questa combinazione di fenomeni comportamentali indotti dalla 5-HT è denominata "sindrome da serotonina" [54].

Ancora, sembra che molte condizioni patologiche nel tratto gastrointestinale siano associate ad alterazioni nei livelli di alcune molecole segnale, tra cui la 5-HT [55].

## Capitolo 3: Materiali polimerici

I polimeri sono macromolecole composte da un elevato numero di unità ripetitive, dette *monomeri*, che si susseguono più o meno regolarmente nella struttura principale.

I polimeri possono essere sintetizzati chimicamente ed elettrochimicamente e ognuna delle due strategie sintetiche ha vantaggi e svantaggi che possono essere riassunti nella seguente tabella 1 [56]:

**Tabella 1. Vantaggi e svantaggi della polimerizzazione chimica ed elettrochimica.**

Strategia di sintesi	Vantaggi	Svantaggi
<b>Chimica</b>	Possibilità di produzione su larga scala	Non possono essere ottenuti strati sottili
	Possibilità di modificazione covalente del polimero dopo la sintesi	Processo sintetico complicato
	Possibilità di modificare la struttura principale del polimero	
<b>Elettrochimica</b>	Possibilità di ottenere strati sottili	Difficoltà di rimuovere il polimero dalla superficie elettroica
	Facilità di sintesi	Difficoltà di modificare la struttura del polimero dopo la sintesi
	Possibilità di intrappolare molecole all'interno del polimero	
	Il drogaggio è simultaneo alla sintesi	

La sintesi elettrochimica [57-60] è un'ottima via alternativa a quella chimica per ottenere polimeri in particolare perché la procedura è relativamente semplice e veloce e non necessita di catalizzatori che talvolta sono difficili da allontanare alla fine del processo sintetico [61,62]. Tale strategia sintetica risale al 1968 quando il "pirrolo nero" fu ottenuto come precipitato sulla superficie dell'elettrodo di platino quando a questo era applicato un potenziale ossidativo [63]. Oggi, la polimerizzazione elettrochimica è ottenuta utilizzando una cella a singolo o doppio compartimento con una configurazione a tre elettrodi (quello di lavoro, quello di riferimento e il contro elettrodo) immersi in una soluzione del monomero e dell'elettrolita di supporto

(agente drogante). La corrente viene fatta passare attraverso la soluzione e l'elettrodeposizione avviene all'elettrodo di lavoro (anodo).

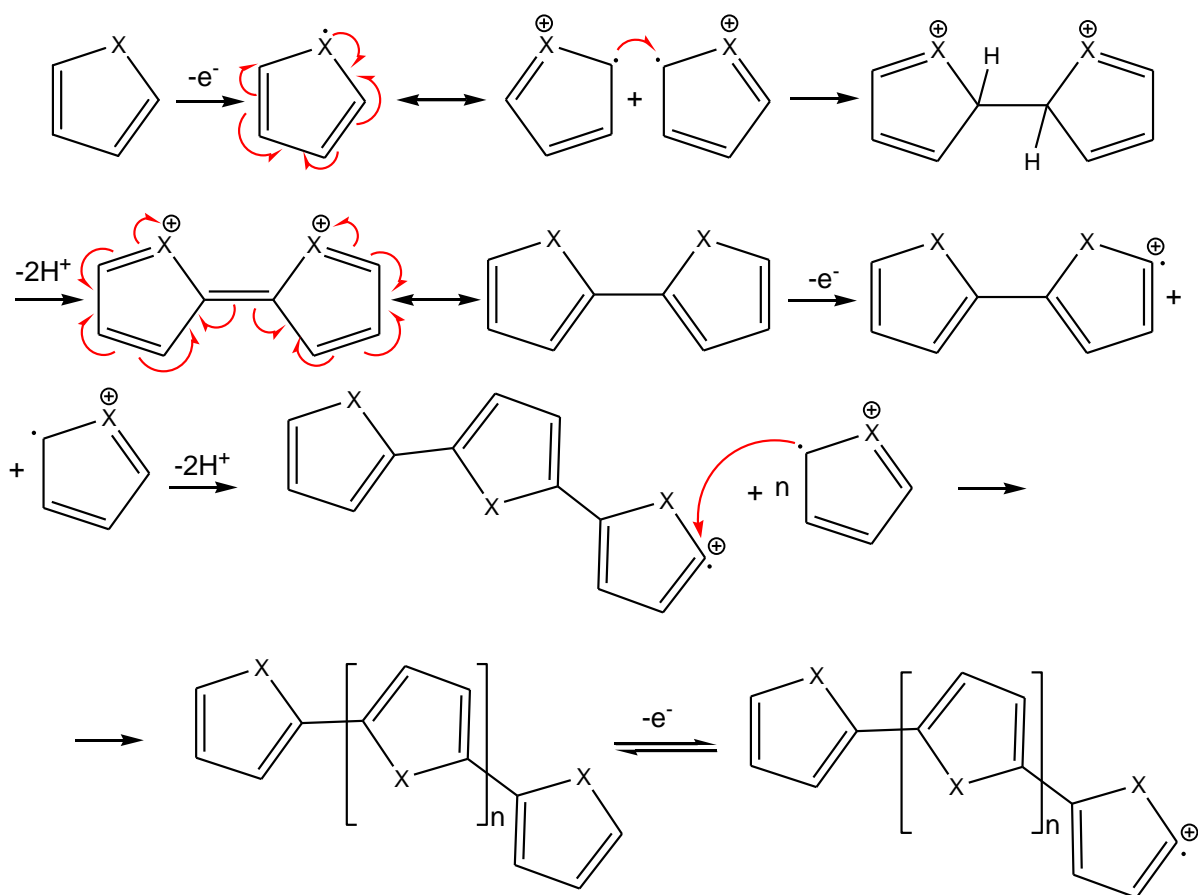
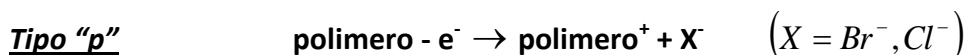


Figura 4. Schema di sintesi elettrochimica.  $X = -NH-, -O-, -S-$ .

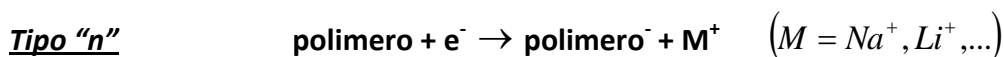
I monomeri alla superficie anodica, come riportato in figura 4, subiscono un'ossidazione a radical-cationi i quali possono reagire con altri monomeri o radical-cationi per formare specie dimeriche e oligomeriche fin tanto che il processo porta alla formazione di specie polimeriche le quali precipitano sulla superficie elettroica quando raggiungono un valore di peso molecolare critico tale da diventare insolubili nel mezzo elettrolitico. Le caratteristiche finali del polimero dipendono da innumerevoli variabili come la durata del processo elettrosintetico, la temperatura di lavoro, il tipo di solvente (acquoso o organico), l'elettrolita di supporto, il tipo di elettrodo di lavoro (Pt, Au o Glassy Carbon, GC) e la quantità di carica che viene fatta passare tra l'elettrodo di lavoro e il contro elettrodo. Ognuno di questi parametri può

influenzare la morfologia del film polimerico e il suo spessore, le sue proprietà meccaniche ed elettrochimiche e la sua conducibilità.

Alla fine del processo sintetico i prodotti polimerici sono ottenuti in forma ossidata e quindi essi conteranno delle vacanze elettroniche controbilanciate dagli anioni presenti nel bagno elettrolitico. In queste condizioni, tali polimeri vengono detti “drogati” perché risultano conduttori, anche se gli anioni non svolgono la funzione dei droganti chimici classici come ad esempio accade per i polimeri del silicio e del germanio che vengono drogati di “tipo n” con gli elementi del V gruppo del sistema periodico o di “tipo p” con gli elementi del VI gruppo del sistema periodico. Analogamente ai semiconduttori inorganici, i polimeri sono detti di “tipo n” quando sono carichi negativamente e di “tipo p” quando sono carichi positivamente. Tale processo di drogaggio può essere schematizzato come segue:



nel caso di un processo ossidativo, oppure:



nel caso di un processo riduttivo.

Un criterio importante nella selezione di polimeri in grado di essere drogati è, pertanto, la facilità con cui essi possono essere ossidati o ridotti.

La classe di composti, in cui gli elettroni  $\pi$  possono essere facilmente rimossi o aggiunti alle catene polimeriche, quali i sistemi polinsaturi e polietarociclici, è particolarmente interessante perché è possibile condurre il drogaggio mediante il processo elettrochimico, polarizzando il composto in un’opportuna cella.

Una polarizzazione catodica indurrà un processo di drogaggio di tipo “n”, accompagnato dall’inserzione di cationi provenienti dalla soluzione elettrolitica. Una polarizzazione anodica, invece, indurrà un drogaggio di tipo “p”, accompagnato dall’inserzione di anioni sempre provenienti dal mezzo elettrolitico.

I processi di drogaggio elettrochimico sono generalmente reversibili e ciò consente l'applicazione di questi materiali per realizzazioni di dispositivi innovativi nel settore elettronico, come quello biosensoristico.

La ricerca è stata quindi indirizzata verso materiali polimerici in grado di offrire migliori prestazioni in termini di stabilità (chimica, elettrochimica e meccanica) e cinetica veloce. In tal senso sono apparsi promettenti i polimeri eterociclici come il polipirrolo e il poli(3,4-etilendiossi)tiofene.

L'aspetto interessante sta nel fatto che è possibile condurre la polimerizzazione e il processo di drogaggio con una singola reazione elettrochimica che, partendo dal monomero, implica la formazione e la deposizione della catena polimerica su un opportuno substrato metallico e successivamente il suo drogaggio (o ionizzazione).

Si ottengono così dei polimeri nei quali la carica è rimossa (o indotta) dalla (o nella) catena polimerica ed è controbilanciata dagli ioni provenienti dalla soluzione elettrolitica i quali sono essi stessi gli agenti droganti.

L'architettura del polimero, conduttore o isolante che sia, deve essere tale da poter permettere:

1. una adeguata attitudine alla funzionalizzazione con un materiale biologico
2. una bassa resistenza alla permeazione dell'analita da testare
3. una elevata resistenza alla permeazione degli interferenti
4. una buona resistenza meccanica alla rottura.

In particolare, la struttura porosa dei polimeri è sfruttata per la loro proprietà di esclusione dimensionale nei confronti degli interferenti.

### **3.1 I polimeri non-conduttori**

La ricerca sui biosensori basati su polimeri elettrosintetizzati ha iniziato a focalizzarsi sull'uso di polimeri non-conduttori, detti anche *isolanti*, come il polifenolo, la poli-*o*-fenilendiammina, il polipirrolo overossidato i quali offrono specifici vantaggi per la costruzione di un biosensore [64-69]. In particolare, la risposta nei confronti dell'analita risulta essere ottimale quando lo strato del polimero è sufficientemente sottile. Infatti, la dipendenza della permselettività dallo spessore della matrice polimerica, è cruciale per la riuscita di tutto il dispositivo. Se il polimero fosse troppo

sottile potrebbe permettere la diffusione indiscriminata di ogni analita elettroattivo presente nel campione da analizzare. Se, al contrario, fosse troppo spesso potrebbe rendere difficoltosa la diffusione, al suo interno, anche per la specie chimica da determinare. L'uso dei polimeri non-conduttori consente di ottenere spessori dell'ordine di 10-100 $\mu$ m. Questa sottigliezza è legata alla stessa natura non-conduttrice del polimero in quanto, durante la sintesi, nel momento stesso in cui esso diventa isolante, non consente più l'ulteriore ossidazione dei monomeri e, di conseguenza, ogni processo di allungamento delle catene fino ad ora formate viene bloccato (crescita autolimitante) [70,71]. Inoltre, i films non-conduttori presentano, grazie al loro ridotto spessore, una cinetica di risposta abbastanza rapida così da ottenere dispositivi che consentano tempi di analisi molto più brevi.

### 3.2 I polimeri conduttori

I polimeri conduttori rappresentano un'importante classe di materiali, in quanto uniscono un elevato interesse industriale per le loro possibili applicazioni tecnologiche, a un altrettanto profondo interesse scientifico per il loro inconsueto e affascinante comportamento. Il primo polimero conduttore fu il polipirrolo (PPy) e fu sintetizzato per la prima volta negli anni '60 ma all'epoca poco fu capito a riguardo di questo materiale e tale scoperta rimase essenzialmente incompresa [72]. Fu solamente nel 1977, quando Alan MacDiarmid, Hideki Shirakawa e Alan Heeger riportarono un incremento di dieci milioni di volte della conducibilità del poliacetilene (PA) drogato con lo iodio, che per la prima volta fu riconosciuta la conduttività dei polimeri [73,74]. Sebbene il poliacetilene, un poliene aciclico, sia ancora uno dei più studiati polimeri in questo campo, esso ha significative limitazioni dovute alla difficoltà nella lavorazione e l'elevata instabilità all'aria. Diversamente dal poliacetilene, il polifenilene (PPh) è noto per la sua elevata stabilità termica come risultato della sua aromaticità [75]. Di conseguenza, lo sviluppo di polimeri conduttori aromatici per diverse applicazioni ha ricevuto molte attenzioni e in particolare i polietereociclici come il già noto polipirrolo (PPy), il politiofene (PT), la polianilina (PANI) e il poli(3,4-etilendioxi)tiofene (PEDOT) cominciarono a svilupparsi intorno agli anni '80, dando il via a una nuova classe di

polimeri conduttori aromatici che mostrava una buona stabilità meccanica ed elettrochimica, una buona conduttività e una facile sintesi [76,77].

Affinché un polimero come il poliacetilene possa condurre, è necessario eseguire un “drogaggio”, ovvero come detto in precedenza è necessario aggiungere al polimero delle sostanze che creino le premesse per il trasporto di carica lungo la catena principale.

Il termine drogaggio rafforza l’analogia fra semiconduttori inorganici e organici, tuttavia è bene notare che mentre nei semiconduttori inorganici il drogaggio è di tipo costituzionale, in quelli organici è piuttosto un processo redox (trasferimento elettronico); inoltre il drogaggio del semiconduttore organico necessita di una quantità di drogante enormemente maggiore rispetto al semiconduttore inorganico. Quindi, un criterio importante per selezionare polimeri potenzialmente conduttori è la facilità con cui il sistema può essere ossidato o ridotto. Questo criterio giustifica in parte la scelta di polimeri coniugati, perché gli elettroni  $\pi$  possono essere facilmente aggiunti o rimossi, in modo da formare un polimero-ione, senza perturbare lo scheletro del polimero stesso. In alcuni casi l’ossidazione o la riduzione del polimero può essere ottenuta elettrochimicamente, sottoponendo il polimero neutro a un’appropriata tensione ossidante o riducente. A tal proposito, un gruppo interessante di polimeri conduttori è rappresentato da quelli preparati per ossidazione elettrochimica e polimerizzazione simultanea di un monomero: ad esempio polipirrolo e politiofene.

Per capire cosa accade quando si droga un generico polimero organico bisogna ricorrere al modello a bande di energia per descrivere le proprietà elettriche dei semiconduttori. Secondo la teoria delle bande, il sovrapporsi di orbitali molecolari nel reticolo cristallino di un solido, forma una serie di orbitali leganti, a bassa energia, e una serie di orbitali antileganti, a più alta energia. Tali bande energetiche sono separate da un intervallo di energia, denominato energy gap ( $E_g$ ). A basse temperature gli elettroni andranno a occupare gli stati a energia più bassa, riempiendo completamente la banda inferiore (banda di valenza, BV), lasciando libera quella superiore (banda di conduzione, BC).

Affinché si verifichi passaggio di corrente attraverso un solido è necessario che gli elettroni possano muoversi sotto l’influenza di un campo elettrico applicato, ricevendo un’accelerazione e, quindi, un incremento energetico. Gli elettroni devono, quindi,



poter acquisire energia cinetica e avere a disposizione un livello energetico superiore disponibile nella banda nella quale gli elettroni possano muoversi. Il comportamento elettrico di un materiale è quindi correlato all'ampiezza della gap energetica e allo stato di occupazione della banda superiore.

Nei conduttori metallici si può riscontrare la condizione in cui la banda di conduzione (BC) sia parzialmente occupata, e quindi, in seguito all'applicazione di un campo elettrico, gli elettroni siano liberi di muoversi. Oppure si può avere una sovrapposizione tra le due bande, con la generazione di un'unica banda. Nei semiconduttori intrinseci la gap che separa le due bande energetiche è piccola ( $<2$  eV), per cui un passaggio di elettroni dalla banda di valenza a quella di conduzione può avvenire, ad esempio, per eccitazione ottica o termica. Infine nei materiali isolanti, la gap energetica che separa le due bande è troppo alta per essere oltrepassata ( $\geq 5$  eV) e quindi non è permesso il passaggio corrente. Nello schema in figura viene presentato quanto sopra detto.

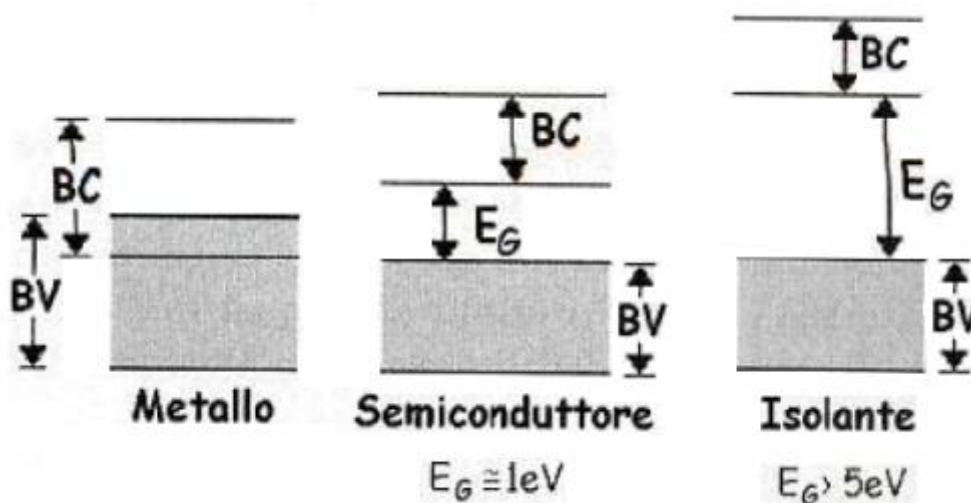


Figura 5 Schema delle bande di energia per metalli, semiconduttori e isolanti.

I polimeri conduttori sono caratterizzati da una struttura organica nella quale si alternano doppi e singoli legami tra atomi che hanno un'ibridizzazione  $sp^2$  la quale conferisce alla matrice polimerica caratteristiche tipiche dei materiali metallici pur mantenendo le caratteristiche tipiche dei materiali plastici. Infatti, l'alternanza dei legami doppi e singoli fa sì che si verifichi una sovrapposizione di nuvole elettroniche degli orbitali p con formazione di una serie di orbitali molecolari  $\pi$  necessari per la conduzione elettrica. La conformazione di questi orbitali è critica per la conduttività del polimero e una minima distorsione nello spazio può avere ripercussioni sulla

conducibilità della matrice polimerica. Questo sistema planare di legami  $\pi$  può permettere agli elettroni di essere delocalizzati sull'intera catena e questo permette la mobilità della carica lungo la struttura del polimero e tra catene vicine ma è limitata dal parziale disordine delle catene e dalle interazioni Coulombiane tra gli elettroni e le vacanze elettroniche. Anche il drogaggio permette di trasformare sistemi isolanti (circa  $10^{-10}$  S/cm) in sistemi conduttori con un aumento della conduzione anche di 12 ordini di grandezza (circa  $10^2$  S/cm) a seconda dell'agente drogante e dell'estensione del drogaggio in quanto è possibile ridurre la distanza tra le bande di conduzione e quelle di valenza [78].

I polimeri conduttori possono essere drogati con una grande varietà di molecole, come sali ionici, peptidi o altri polimeri tra cui alcuni polisaccaridi, proteine e alcuni polimeri organici come il polistirensulfonato sodico (NaPSS).

I polimeri conduttori hanno proprietà elettriche e ottiche simili a quelle dei semiconduttori inorganici, oltre a quelle tipiche dei polimeri convenzionali, quali la facilità di sintesi e la lavorazione [79]. Quest'unica combinazione di proprietà ha dato a questi materiali un vasto range di applicazione nell'industria microelettronica, incluse applicazioni nella tecnologia delle batterie, nel campo del fotovoltaico, nei diodi a emissione di luce, nei display elettrocromici [80] e più recentemente nel campo dei biosensori. La ricerca sui polimeri conduttori per applicazioni biomediche si è espansa fortemente, con la scoperta negli anni '80, della loro biocompatibilità e la loro abilità a intrappolare e a rilasciare materiale biologico tale da renderli utili come dispositivi analitici (biosensori), come dispositivi per il rilascio controllato di farmaci e come scaffolds per la ricostruzione di tessuti ossei, neuronali, tendinei, etc. Nella metà degli anni '90 fu dimostrato che i polimeri conduttori erano in grado di modulare le attività cellulari, come ad esempio l'adesione, la migrazione, la sintesi del DNA e la secrezione di proteine [81-84]. Proprio grazie all'elevata biocompatibilità di questi materiali, molti di questi studi sono stati effettuati su cellule dei nervi, del midollo, dei muscoli e del cuore proprio perchè esse sono in grado di rispondere a impulsi elettrici transmembrana. Inoltre i polimeri conduttori ottenuti per via elettrochimica hanno ulteriori vantaggi rispetto ad altri materiali: sono facili da sintetizzare, poco costosi e inoltre sono estremamente versatili in quanto hanno proprietà che possono essere modulate prontamente da una vasta gamma di molecole che possono essere

intrappolate all'interno della struttura polimerica. I polimeri conduttori possono, inoltre, essere ottenuti in diverse forme, non solo come film monostrato o multistrato, ma anche in forma di nanotubi in modo tale da poter aumentare drasticamente l'estensione superficiale (anche di cinquanta volte) di un normale elettrodo di platino [85].

I polimeri conduttori hanno un ulteriore grande vantaggio rispetto ad altri materiali: la stabilità redox che li rende robusti e difficilmente deteriorabili per lo scopo per il quale sono progettati. Infatti, se usati in dispositivi analitici come i biosensori, devono essere in grado di non subire degradazione redox a seguito del contatto con gli innumerevoli agenti ossidanti e riducenti presenti nei fluidi biologici come sangue, latte, siero e urine.

Le strategie per funzionalizzare i polimeri conduttori e renderli adatti a un preciso scopo biomedico o bioanalitico, sono molteplici. Infatti, questo può essere ottenuto con differenti tecniche tra cui l'adsorbimento fisico, l'intrappolamento, il drogaggio e il legame covalente diretto o mediante l'uso di molecole cross-link. La tecnica di adsorbimento è estremamente facile e versatile ma non sempre si riesce a rendere stabile nel tempo il dispositivo ottenuto che può, perciò, andare in contro a inattivazione a seguito del desorbimento della molecola bioattiva. Un altro metodo che non prevede il legame covalente è l'intrappolamento il quale può essere ottenuto mediante l'uso della molecola bioattiva nella stessa soluzione elettrolitica del monomero durante la polimerizzazione. Alternativamente, metodi che prevedono il legame covalente possono essere utilizzati per la funzionalizzazione permanente di tali matrici polimeriche. Infatti, il monomero può essere sintetizzato con un adatto gruppo funzionale (ad esempio un gruppo carbossilico o un gruppo amminico per la formazione di un legame estereo, ammidico o peptidico) che non deve reagire durante il processo di polimerizzazione. Dopo l'elettropolimerizzazione è possibile eseguire, poi, una modifica covalente su tale gruppo funzionale ma è importante tenere presente che gli effetti sterici sulla struttura del polimero a seguito di tale modifica possono alterare la planarità del sistema coniugato degli orbitali  $\pi$  tale da manifestare una diminuzione di conducibilità. È difficile comparare i polimeri conduttori variamente modificati mediante differenti tecniche poiché una tecnica di funzionalizzazione non è universalmente adatta a tutti i tipi di materiali e per tutte le tipologie di applicazione.

### 3.3 Polipirrolo overossidato come polimero non-conduttore

Il polipirrolo overossidato (OPPy) è un materiale non-conduttivo innovativo per la costruzione di biosensori in quanto è un composto dotato di stabilità chimica, semplicità di polimerizzazione e flessibilità per le varie tecniche di immobilizzazione delle molecole biologiche usate per la caratterizzazione del biosensore (come ad esempio la *glucosio ossidasi*, GOD).

La sua formazione avviene grazie all'applicazione di un potenziale anodico il quale determina l'irreversibile ossidazione delle unità monomeriche portando progressivamente alla formazione di una membrana di polipirrolo (PPy).

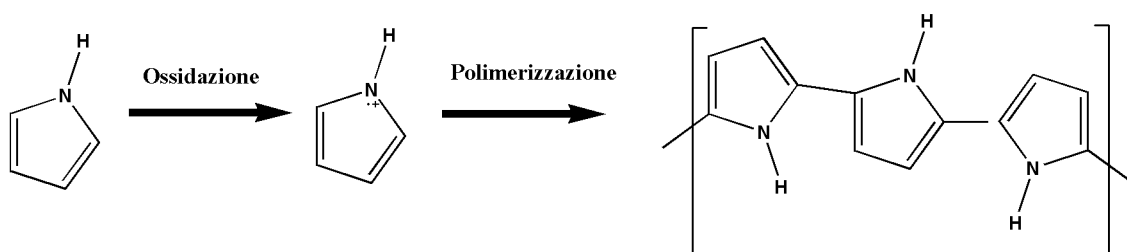
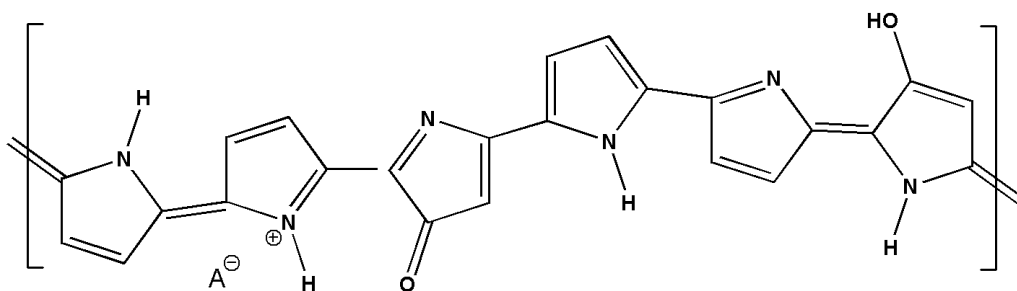


Figura 6. Reazione elettrochimica per la polimerizzazione del pirrolo (PPy).

Quest'ultima è resa isolante (OPPy) grazie ad un processo (degenerativo spontaneo) di overossidazione, condotto in mezzo acquoso, il quale si pensa sia dovuto alla presenza di radicali ossidrilici ( $\text{OH}^\bullet$ ) formati per ossidazione del solvente stesso. Il coinvolgimento del radicale ossidrilico è stato dimostrato conducendo il processo di overossidazione in presenza di *radical scavengers* [86], come metanolo e dimetilurea, e ciò ha permesso di aumentare la stabilità del polipirrolo sottoposto a un potenziale anodico ossidativo.

Nonostante ancora non si conosca il reale responsabile dell'overossidazione, tale processo degenerativo porta alla seguente struttura:



**Figura 7. Struttura del polipirrolo overossidato (OPPy) ottenuto per trattamento potenziostatico ossidativo.**

La principale caratteristica del polipirrolo overossidato è legata al fatto che esso può essere considerato *di-drogato* in quanto gli anioni dell'elettrolita di supporto, rimasti intrappolati durante la sintesi, vengono espulsi e alcuni gruppi carbonilici vengono a formarsi nella posizione  $\beta$  dell'anello del pirrolo [87-90].

Alcuni autori si sono focalizzati sulla dipendenza del potenziale di overossidazione dal pH della soluzione nella quale questo processo viene condotto. Le evidenze sperimentali hanno portato a concludere che più alto è il valore del pH e più è basso il potenziale di ossidazione. Infatti, l'overossidazione del polipirrolo avviene in modo più efficace in soluzioni alcaline per NaOH che in soluzioni di NaCl [91] e alcuni studi [92,93] hanno dimostrato che, in soluzione acquosa, l'overossidazione inizia ad un potenziale intorno a 0.65V vs Ag/AgCl a pH 6 con una forte dipendenza del potenziale dal pH.

L'overossidazione è un processo che avviene spontaneamente nelle membrane che sono sottoposte a ripetute ciclagioni elettrochimiche o a polarizzazioni le quali alterano le proprietà di conduzione del PPy inducendo in questo caso una perdita di conducibilità e una contemporanea migliore stabilità meccanica del film.

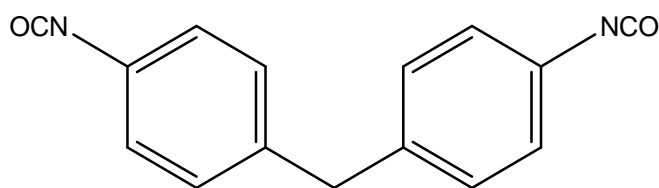
### 3.4 Poli(etereuretano acido) come polimero non conduttore

I poliuretani [94,95] sono una classe di polimeri importante e versatile. Sono largamente utilizzati in applicazioni biomediche per le loro buone proprietà meccaniche e fisiche e per la loro buona biocompatibilità e antitrombogenicità. Sono state messe a punto molte strategie per incrementare le applicazioni del poliuretano in campo biomedico [96-103] come, ad esempio, è stata ampiamente

studiata l'eparinizzazione di tale polimero. Infatti il legame tra l'eparina e il polietereuretano fa sì che si vengano a formare gruppi ammonici quaternari sia lungo la catena sia nei gruppi laterali della stessa e ciò comporta un aumento dell'emocompatibilità del polimero [104-106]. Sul polietereuretano sono possibili anche altre modifiche, quali ad esempio, l'introduzione di gruppi funzionali in grado di legare l'albumina, come ad esempio, gruppi solfonici o solfati [107-109] in modo tale che, grazie alla presenza di suddetta proteina, il polimero abbia un potere trombogenico quasi nullo. Pertanto l'introduzione, nella catena principale, di gruppi funzionali in grado di formare interazioni di tipo ionico o covalente con altre molecole, rende possibile il miglioramento di alcune delle proprietà come, ad esempio, l'adesività e l'emocompatibilità utile per scopi biomedici [101,110].

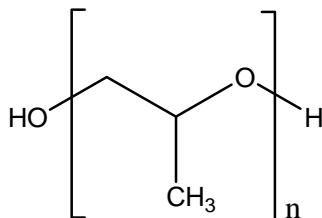
I poliuretani segmentati sono copolimeri la cui unità ripetitiva è generalmente composta da segmenti rigidi, alternati a segmenti flessibili.

In particolare, nei polietere uretani (PEU) la parte rigida è rappresentata dal metilene-bis-4,4'-fenilisocianato (MDI):



**Figura 8. Metilene-bis-4,4'-fenilisocianato (MDI)**

Il segmento flessibile è composto principalmente da un poliglicole, come il poli-propilenossido (PPO):



**Figura 9. Poli-propilenossido (PPO)**

La possibilità di introdurre nel poliuretano un gruppo carbossilico attraverso una reazione sul segmento rigido del MDI mediante un glicole carbossilato, come l'acido di-idrossimetilpropionico (DMPA), appare molto interessante:

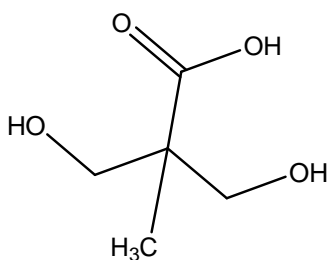


Figura 10. Acido di-idrossimetilpropionico (DMPA)

La reazione, a temperatura moderata, tra l'isocianato aromatico con l'acido alifatico da come prodotti finali un'anidride acida, urea e anidride carbonica [111,112] secondo il seguente schema:

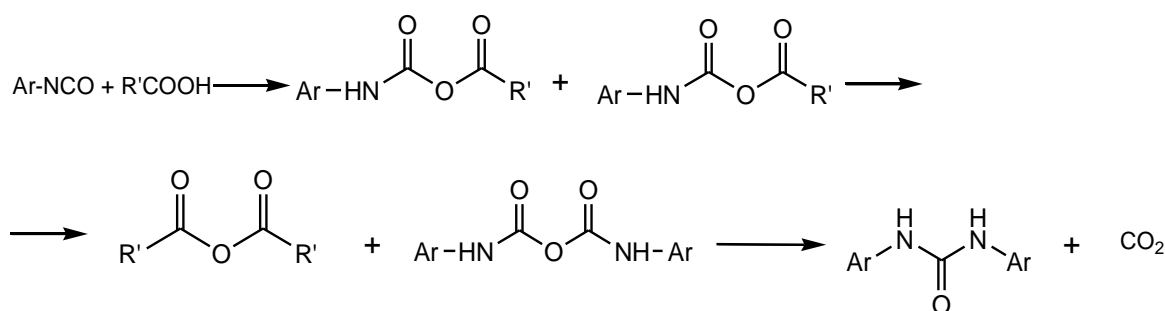


Figura 11. Meccanismo generale di sintesi del PEUA

La sintesi del PEUA per questo lavoro di tesi è stata effettuata in due step secondo il metodo di Marconi e collaboratori [95]. L'unità ripetitiva del PEUA è riportata di seguito e il gruppo funzionale di interesse, per questo lavoro, è rappresentato dal gruppo carbossilico del DMPA (cerchiato in rosso).

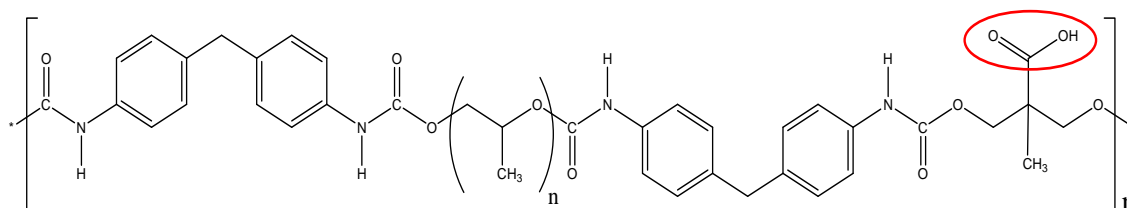


Figura 12. Unità ripetitiva del poli-etere-uretano-acido (PEUA)

### 3.5 Poli(3,4-etilendiossi)tiofene come polimero conduttore

Durante la seconda metà degli anni '80, gli scienziati dei laboratori di ricerca della Bayer AG svilupparono un nuovo derivato del politiofene, il poli(3,4-etilendiossitiofene), con la struttura mostrata in figura 13.

Questo polimero, spesso abbreviato PEDT o PEDOT [113], fu inizialmente sviluppato per dare polimeri conduttori solubili [114-118] utili in vari settori come ad esempio nelle coperture antistatiche per tubi a raggi catodici [119,120], nei dispositivi fotovoltaici [121,122] e in applicazioni sensoristiche [123]. Preparato usando una classica ossidazione chimica o una polimerizzazione elettrochimica, il PEDOT è stato scoperto essere insolubile, tuttavia mostra molte proprietà interessanti. Oltre ad avere una conducibilità molto alta (circa 300 S/cm), il PEDOT è quasi trasparente quando presente come film sottili ed ossidati, e mostra un'alta stabilità. Il problema della solubilità è stato successivamente aggirato usando un polielettrolita solubile in acqua, il polistirensolfonato sodico (NaPSS), come contro-ione durante la polimerizzazione dell'EDOT e come agente drogante. Questo ha portato alla combinazione di un sistema conduttore con un polielettrolita solubile in acqua con buone proprietà meccaniche, alta conducibilità (circa 10S/cm), alta trasmissività nella luce visibile, ed eccellente stabilità. I film di PEDOT:PSS possono essere riscaldati all'aria a 100°C per oltre 1000 ore con solo una leggera variazione di conducibilità. Questo nuovo sistema viene conosciuto sotto il nome commerciale di BAYTRON P (P sta per polimero). Recenti lavori ne hanno dimostrato una elevata biocompatibilità, dovuta alla sua struttura simile ai materiali naturali come la melanina [124] e ciò ne permette anche una polimerizzazione direttamente in tessuti viventi [125].



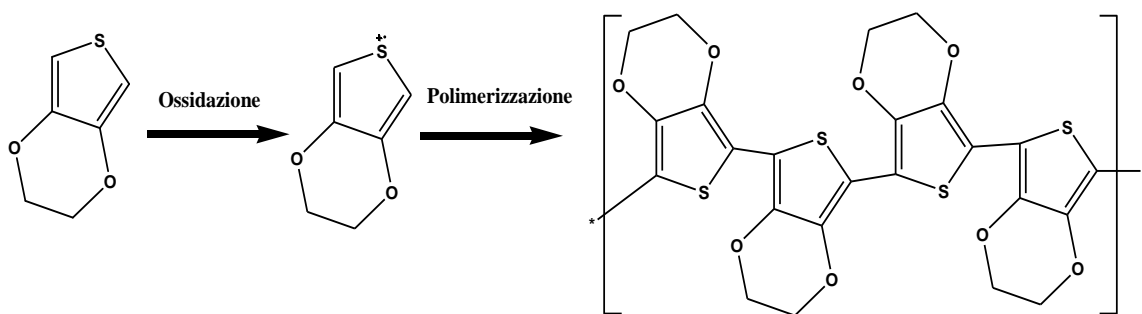


Figura 13. Reazione elettrochimica per la polimerizzazione del 3,4-etilendiossitiene (EDOT) per formare il poli(3,4-etilendiossi)tiotene (PEDOT).

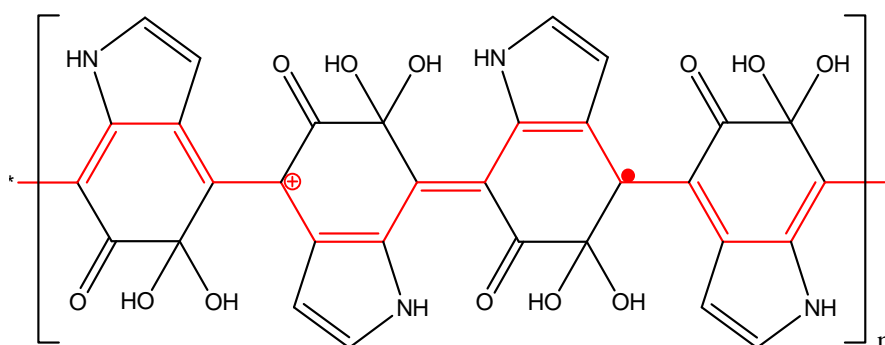


Figura 14 Struttura della melanina. Da notare la similitudine con la struttura del PEDOT

Il poli(3,4-etilendiossi)tiotene presenta due possibili strutture energeticamente degeneri.

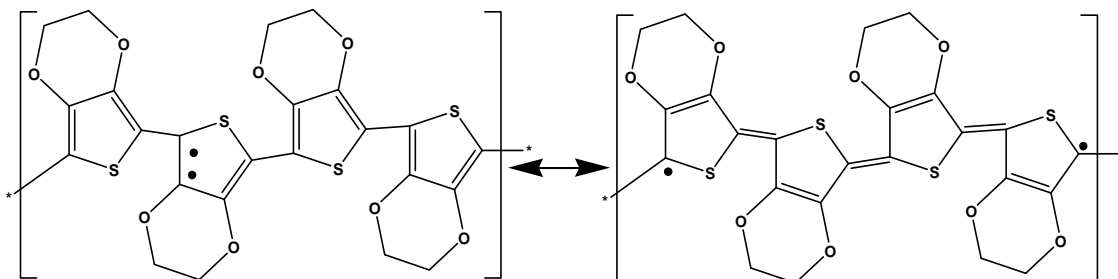


Figura 15 Doppia configurazione per il polimero PEDOT tra forma benzoica e chinonica.

Queste due strutture, assolutamente identiche, rappresentano due stati isoenergetici separati da una barriera energetica praticamente nulla. Pertanto, in una stessa macromolecola esse possono coesistere contemporaneamente. La catena tenderà ad assumere spontaneamente la configurazione perfettamente dimerizzata, corrispondente allo stato fondamentale. Tuttavia ciò è possibile solo a livello teorico dal momento che possono esistere vincoli topologici che impediscono il rilassamento. Per esempio, considerando un caso in cui la catena presenti un numero dispari di atomi di carbonio, nello stato perfettamente dimerizzato dovrebbe presentare

necessariamente un legame doppio ad un'estremità ed uno singolo all'altra. Gli effetti di bordo fanno sì che lo stato ad energia più bassa di una catena isolata presenti doppi legami ad entrambi gli estremi. Pertanto dovrà realizzarsi nella catena un mutamento nella fase dell'alternanza di legami (difetto coniugazionale), con una zona di transizione che si estende per qualche distanza interatomica, lasciando sostanzialmente imperturbata la maggior parte della catena. Questa zona di transizione prende il nome di solitone. La presenza di questa particolare situazione rompe la periodicità della catena e induce quindi la comparsa di livelli energetici localizzati: in particolare si ha qui la formazione di un solo livello, con energia tale da porlo esattamente al centro dell'intervallo proibito. Nel materiale non drogato questo livello è occupato da un solo elettrone.

Il moto di tale solitone neutro non comporta però alcun trasferimento di carica elettrica, e non può, quindi, essere utilizzato per interpretare la conducibilità del poli(3,4-etilendiossio)tiofene. Per spiegare il fenomeno della conduzione è necessaria la creazione di portatori di carica con conseguenti variazioni chimiche del sistema polimerico. Questo può essere effettuato tramite attivazione chimica o ottica. In questa sede ci si limiterà ad occuparsi della sola attivazione chimica, la quale può essere realizzata tramite l'uso di sostanze ossidanti o riducenti, in grado di sottrarre o cedere elettroni al sistema  $\pi$  del polimero.

Il modello del solitone carico è però applicabile ad un numero ridotto di casi e rappresenta la base teorica, da cui si sono sviluppati altri modelli teorici in grado di descrivere i fenomeni conduttivi di sistemi policoniugati più complessi (eterociclici) di molecole non planari o non dotate di forme isomeriche degeneri.

In questi casi, sono stati ipotizzati i modelli del polarone e del bipolarone. In ambedue i casi, a seguito di drogaggio ossido-riduttivo, si creano delle "isole" cariche e mobili lungo la catena polimerica. Il polarone è un radical catione i cui livelli energetici, anche in questo caso, andranno a disporsi tra la banda di valenza e quella di conduzione. L'aggiunta di ulteriore agente drogante può dare luogo a diversi effetti. Se il secondo elettrone che viene rimosso è lontano dal polarone, se ne formerà un ulteriore, ignorando sostanzialmente l'esistenza dell'altro. Se invece essi sono vicini, il meccanismo energeticamente favorito è quello del trasferimento dell'elettrone della seconda impurezza al livello polaronico formato dalla prima, formando il cosiddetto

bipolarone. All'aumentare del drogaggio si cominciano poi a sovrapporre le nubi elettroniche di solitoni, polaroni ed altri difetti strutturali, perdendo così la loro identità. Avviene, a questo punto, una transizione semiconduttore-metallo, evidenziata dal brusco aumento della conducibilità elettrica, attraverso la formazione di bande bipolaroniche. Il bipolarone possiede a differenza del polarone una doppia carica (+ o -) con spin totale nullo.

La ragione alla base della grande versatilità del poli(3,4-etilendiossi)tiofene è legata al suo basso band gap tra le bande di conduzione e quelle di valenza. Queste proprietà derivano primariamente dall'alta regolarità dell'ossatura del polimero che presenta monomeri legati tra di loro con legami del tipo  $\alpha \rightarrow \alpha'$  grazie alla presenza del sostituente 3,4-diossietilenico nelle posizioni  $\beta$  e  $\beta'$ . Similmente, nel già noto poli(3,4-dimetossi)tiofene, i due ossigeni direttamente legati alla struttura del anello eterociclico arricchiscono di elettroni i legami coniugati di tipo  $\pi$  in modo tale da abbassare ulteriormente il potenziale di ossidazione del polimero. In più, il carattere ciclico dell'etilendiossi-sostituente minimizza il disordine nel riarrangiamento delle catene di polimero facendo in modo che presenti una certa linearità dato che un lato del monomero è costantemente occupato [126].

In questo polimero conduttore è possibile indurre delle vacanze elettroniche (drogaggio p) tali da portare alla formazione di una carica localizzata nella catena con conseguente distorsione e rilassamento del reticolo cristallino. Si ottiene così la formazione di un polarone che, in termini chimici, rappresenta uno ione radicale associato ad un rilassamento della geometria strutturale verso una forma chinonica che si estende per circa quattro anelli monomerici. La presenza di un certo numero di polaroni (corrispondente ad un certo livello di drogaggio) nella struttura del polimero consente di ottenere dei livelli elettronici posizionati a circa 0.5eV dalle bande di conduzione e di valenza tale da abbassare il loro band gap. Quando vengono rimossi dalla catena un certo numero di elettroni, si formano i così detti bipolaroni definibili come una coppia di cariche simili associata ad una forte distorsione (localizzata) del reticolo cristallino che sempre si estende su quattro anelli monomerici. Il rilassamento energetico è più forte di quello del singolo polarone e pertanto i livelli energetici occupabili dagli elettroni si posizionano a circa 0.75eV dalla banda di conduzione e quella di valenza abbassando ulteriormente il loro band gap.

Ad alto livello di drogaggio (circa il 33% per unità monomerica ripetitiva), la sovrapposizione tra gli stati polaronici porta alla formazione nel gap di due bande polaroniche di circa 0.4eV di ampiezza.

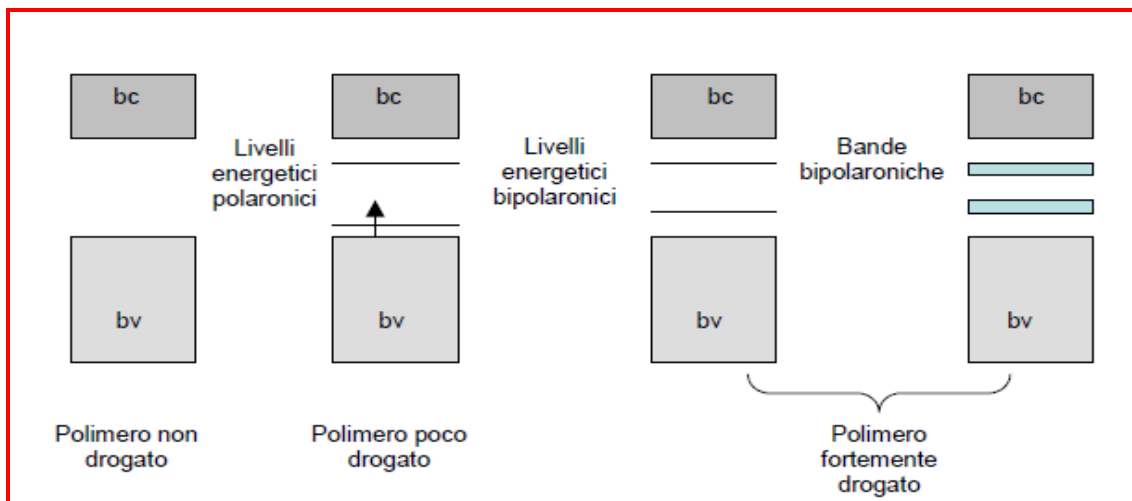


Figura 16. Livelli energetici degli elettroni nei polimeri conduttori a differente livello di drogaggio.

La struttura a bande così descritta giustifica il fatto che sotto l'applicazione di un campo elettrico, i bipolaroni privi di spin e che trasportano due cariche, possono diventare mobili soprattutto ad alto livello di drogaggio (cioè quando l'attrazione Coulombiana con i controioni è largamente schermata). Il meccanismo di conduzione è largamente inusuale poiché avviene anche se la banda di conduzione rimane completamente vuota e quella di valenza completamente piena: in effetti la corrente non è trasportata dagli elettroni della banda di conduzione ma dai bipolaroni mobili. Questo trasporto bipolaronico è accompagnato dal trasporto dei contro ioni che devono diffondere lungo la catena polimerica per compensare il moto delle cariche positive [127-129]. I polaroni implicano un momento magnetico e possono, perciò, essere osservati e distinti dai bipolaroni diamagnetici attraverso la spettroscopia ESR (Electron Spin Resonance) [130]. Tuttavia i bipolaroni non sono indifferenti nei confronti del loro intorno elettrochimico e, poiché in un intermedio livello di drogaggio coesistono insieme ai polaroni e interagiscono con essi [129], la risposta spettroscopica dei polaroni sarà influenzata dalla presenza e dalle proprietà dei suddetti bipolaroni così come altre specie paramagnetiche che potrebbero essere presenti nel materiale polimerico.

## Capitolo 4: Le nanotecnologie

### 4.1 Nanotecnologie e nanoscienze

Non esiste ancora una definizione universalmente accettata per nanoscienze e nanotecnologie, ma ve ne sono diverse simili tra loro. Secondo quella data nel 2004 dal Royal Society & The Royal Academy of Engineering (UK):

"La nanoscienza è lo studio dei fenomeni e della manipolazione di materiali su scala atomica, molecolare e macromolecolare, dove le proprietà differiscono notevolmente da quelle su scala più ampia" e "Le nanotecnologie sono l'insieme della progettazione, della caratterizzazione, della produzione e dell'applicazione di strutture, dispositivi e sistemi per il controllo della forma e della dimensione di un materiale su scala nanometrica".

Analoga è la definizione data nel 2000 nell'ambito della National Nanotechnology Initiative (NNI) in USA:

"La nanotecnologia è la comprensione ed il controllo della materia su dimensioni di circa 1 a 100 nanometri, dove fenomeni unici consentono nuove applicazioni". A questo livello, le proprietà fisiche, chimiche e biologiche dei materiali differiscono in modo fondamentale ed importante da quelle dei singoli atomi e molecole o dell'intera materia.

In sintesi, con il termine di nanotecnologia si intende la capacità di osservare, misurare e sfruttare la materia su scala atomica e molecolare [131].

Un nanometro (nm) è infatti un milionesimo di metro e corrisponde all'incirca a 10 volte la grandezza dell'atomo dell'idrogeno mentre le dimensioni di una proteina semplice sono intorno a 10 nm.

Il mondo delle nanotecnologie è quello compreso tra 1 e 100 nanometri e sono "nanoprodotti" quei materiali o dispositivi nei quali vi è almeno un componente funzionale con dimensioni inferiori a 100 nm.

Le prospettive rivoluzionarie associate alla nanotecnologie derivano dal fatto che, come detto, a questi livelli di dimensioni, comportamenti e caratteristiche della materia cambiano drasticamente [132] e le nanotecnologie rappresentano un modo

radicalmente nuovo di produrre per ottenere materiali, strutture e dispositivi con proprietà e funzionalità grandemente migliorate o del tutto nuove.

Le ricerche in corso hanno uno spettro molto ampio e riguardano: lo sviluppo e l'applicazione di materiali nuovi o migliorati (per i trasporti, le tecnologie dell'informazione, le telecomunicazioni, l'informatica); prodotti chimici nuovi o migliorati (per es. nuovi catalizzatori); lo sviluppo di nuovi farmaci e di nuovi sistemi o dispositivi di cura; le applicazioni per l'ambiente e per l'energia (stoccaggio e produzione); la messa a punto di nuovi prodotti cosmetici; l'industria alimentare e lo sviluppo di prodotti per il settore della difesa e quello aerospaziale.

A livello di nanoscala, i materiali possono essere "adattati" in modo da presentare qualità che possono essere sfruttate per realizzare dispositivi e sistemi sempre più veloci, leggeri, robusti ed efficienti, oltre che nuove classi di materiali. L'uso di nanoparticelle e nanostrutture è in costante aumento nei processi analitici [133].

## 4.2 Nanomateriali

Le dimensioni svolgono un ruolo decisivo quando si passa dalla fase macroscopica a quella nanoscopica. In un solido macroscopico, infatti, gli atomi perdono la propria identità e cooperano alla determinazione delle proprietà fisico-chimiche macroscopiche del solido intero; quando ci si avvicina al nanometro, gli effetti quantistici dei singoli atomi (cioè la disposizione e il volume che essi occupano nello spazio) non sono più trascurabili: è questo il campo dei nanomateriali, considerati l'output più importante delle nanotecnologie da un punto di vista industriale. Questi materiali, a prima vista, non differiscono da quelli strutturati su scala convenzionale, ma le loro proprietà sono modificate, manipolandone le strutture a livello delle particelle che li compongono. E' opportuno distinguere tra:

- *"nanostrutture"*: strutture con dimensioni dell'ordine dei nanometri;
- *"materiali nanostrutturati"*: materiali i cui elementi costitutivi, quali particelle, aggregati o cavità, hanno almeno una dimensione inferiore a 100 nm.

Due sono i principali fattori che differenziano i nanomateriali dagli altri materiali:

- La maggiore estensione superficiale, per cui una data massa di materiale nanodimensionato sarà molto più reattiva della stessa massa di materiale fatta di

particelle più grandi; questo perché gli atomi alla superficie dei nanomateriali hanno numeri di coordinazione più bassi e quindi sono meno stabili rispetto agli atomi dei materiali bulk.

- Gli effetti quantici, che influenzano il comportamento ottico, elettrico e magnetico dei materiali.

La sensibilità e le performance dei biosensori migliorano notevolmente se si usano nanomateriali per il loro assemblaggio [134].

I polimeri conduttori possono essere sfruttati come eccellenti strumenti per la preparazione di nanocompositi con intrappolate biomolecole in nanoscala [135].

Per mantenere la bioattività delle molecole e per dare un segnale di output elettrochimico richiesto c'è la necessità di un'appropriata bioimmobilizzazione [136].

Nanoparticelle, nanotubi e nanofili sono dei nanomateriali utilizzati per l'assemblaggio di biosensori elettrochimici. Le prime sono preparate tramite riduzione chimica del corrispondente sale del metallo di transizione in presenza di uno stabilizzatore, che si lega sulla loro superficie conferendo grande stabilità e migliorandone alcune caratteristiche. Le nanostrutture come i nanotubi dei metalli e i nanofili di polimeri conduttori o non, sono ottenuti attraverso l'utilizzo di template, sia per via elettrochimica sia per quella chimica [137,138].

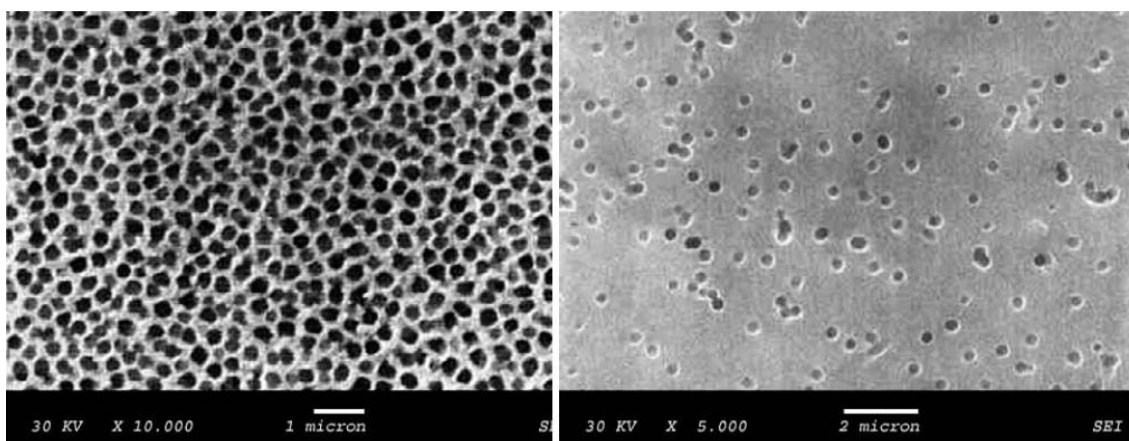
#### 4.3 Nanotubi d'oro

L'obiettivo di questo lavoro di ricerca si è basato sullo sviluppo di nanomateriali per applicazioni sensoristiche e biosensoristiche focalizzandosi sia sulla preparazione e caratterizzazione di tali dispositivi e sia verso l'applicazione degli stessi per sistemi di analisi.

Una delle tecniche più innovative per la sintesi di questo insieme non ordinato di elettrodi nanoscopici è la cosiddetta *template synthesis* la quale fa uso di membrane da filtrazione microporose come stampo per la deposizione "electroless" del metallo all'interno delle cavità.

Esistono due principali tipi di membrane per la deposizione dei nanoelettrodi: quelle polimeriche [139] (di policarbonato, poliammide, tereftalato o polietilene) e quelle di allumina. Entrambi i tipi sono commercialmente disponibili e possono anche essere

ottenute con una specifica geometria su richiesta al produttore (quelle di allumina, inoltre, possono essere sintetizzate anche in laboratorio). La maggiore differenza morfologica tra le membrane di allumina e quelle polimeriche è legata alla sintesi. Infatti quelle di allumina, essendo ottenute per anodizzazione dell'alluminio [140,141], sono caratterizzate da un'elevatissima densità di pori tale che il rapporto tra l'area totale dei pori e tutta l'area geometrica è un numero non molto più piccolo dell'unità. Viceversa, le membrane polimeriche sono caratterizzate da una densità di pori molto più bassa. Quest'ultime sono ottenute per irraggiamento dei fogli di polimero con frammenti ottenuti dalla fissione nucleare dei metalli pesanti come californio o uranio oppure attraverso ioni in uscita dagli acceleratori.



**Figura 17** Immagine SEM di due membrane commerciali con diametro di 200nm: a sinistra una di allumina e a destra una di policarbonato.

Il vantaggio offerto dalle membrane di policarbonato è dato dal fatto che esse sono molto flessibili mentre quelle di allumina sono rigide e fragili, ma in contrapposizione i pori ottenuti dai frammenti della fissione non sono sempre paralleli tra loro e sono distribuiti in modo del tutto casuale sulla superficie polimerica a meno che non venga applicata una specifica procedura di sintesi [142].

Sebbene entrambe le membrane possono essere utilizzate per l'assemblaggio di nanoelettrodi, le membrane polimeriche sono da preferirsi perché loro permettono di avere una maggiore distanza tra i singoli elementi nanoelettrodici come richiesto da applicazioni in campo elettroanalitico.

Nel 1995, C. Martin e V. Menon [143] idearono una procedura che prevedeva la deposizione di un metallo, l'oro, all'interno dei pori delle membrane di policarbonato nanoporose (polycarbonate particle track-etched membranes, PTM). Il numero dei



nanotubi ottenuti per centimetro quadrato, è determinato dalla densità dei pori nella membrana di supporto; generalmente queste hanno un'alta densità di pori, circa  $6 \times 10^8$  pori/cm<sup>2</sup>. I diametri dei pori stabiliscono i diametri esterni dei nanotubi e la loro lunghezza invece, dipende dal tempo di crescita. Gli elettrodi assemblati con i nanotubi hanno mostrato di reagire anche a piccole tracce di ioni e molecole, cosa lontana dalla sensibilità degli elettrodi convenzionali. Il metallo usato, l'oro, garantisce un materiale conduttore, stabile, malleabile, duttile, di facile reperibilità e pulito (non occorre infatti purificarlo come avviene invece con i nanotubi di carbonio). La deposizione della soluzione di oro rappresenta un metodo di sintesi semplice, economico, riproducibile e non comporta l'uso di strumentazioni particolari. Martin e Menon, infatti, dimostrarono che il limite di detenzione ottenuto con gli elettrodi nanoscopici era molto più basso, circa tre ordini di grandezza in meno, rispetto al corrispondente limite di determinazione degli elettrodi macroscopici convenzionali.

#### **4.3.1 Nanoelettrodi d'oro**

I nanoelettrodi sono degli avanzati sistemi elettrodici nanostrutturati [144]. Le caratteristiche elettrochimiche che li contraddistinguono rispetto agli elettrodi convenzionali sono:

- Drammatica diminuzione delle correnti capacitive del doppio strato
- Estrema sensibilità alla cinetica dei trasferimenti di carica, il che significa che si ha una elevata capacità di misurare elevati valori di queste costanti.

Poiché queste sono caratteristiche imprescindibili dei nanoelettrodi, in assenza della possibilità di dare informazioni morfologiche mediante SEM o TEM, l'assenza di queste due caratteristiche (come ad esempio la persistenza di elevate correnti capacitive) deve essere presa come indicazione del fallimento della procedura di preparazione dei nanoelettrodi.

Da un punto di vista voltammetrico, i nanotubi possono essere considerati come un insieme di nanodischi tra i quali si interpone un materiale non conduttivo che li isola elettricamente. Un ultramicroelettrodo è considerato come un elettrodo con almeno una dimensione comparabile o più bassa dello spessore diffusionale (tipicamente meno di 25µm). Come per molti altri piccoli elettrodi, l'effetto bordo diventa

rilevante e la diffusione dal bulk della soluzione all'elettrodo è descritta in termini di geometria radiale invece di una semplice geometria lineare tipica degli elettrodi più grandi ( $> 100\mu\text{m}$ ). I nanoelettrodi possono essere considerati come un insieme di tanti ultramicroelettrodi confinati in una piccola superficie. Poiché il numero di nanotubi è grande ( $10^6$ - $10^8$  elementi/ $\text{cm}^2$ ), ognuno di essi è statisticamente equivalente e il differente contributo degli elementi che si trovano all'esterno può essere considerato trascurabile [145,146], anche in elettrodi la cui superficie totale è più piccola di  $10^{-2}$ - $10^{-3} \text{ cm}^2$  [145].

I nanoelettrodi possono dare due distinte curve voltammetriche a seconda della velocità di scansione a cui vengono effettuate o a seconda della distanza che separa i nanotubi [147,148]. Quando i raggi di diffusione dei singoli nanoelettrodi si sovrappongono totalmente (e cioè quando il raggio dell'emisfera di diffusione è maggiore dell'emidistanza media tra gli elettrodi), l'insieme di tutti i nanoelementi può essere considerato come un macroelettrodo piano per quanto riguarda le correnti Faradiche (condizione di totale sovrapposizione). Quando le emisfere diffusionali diventano più piccole (a basse velocità di scansione), la risposta in corrente è dominata dalla diffusione radiale ad ogni singolo nanoelemento (condizione puramente radiale).

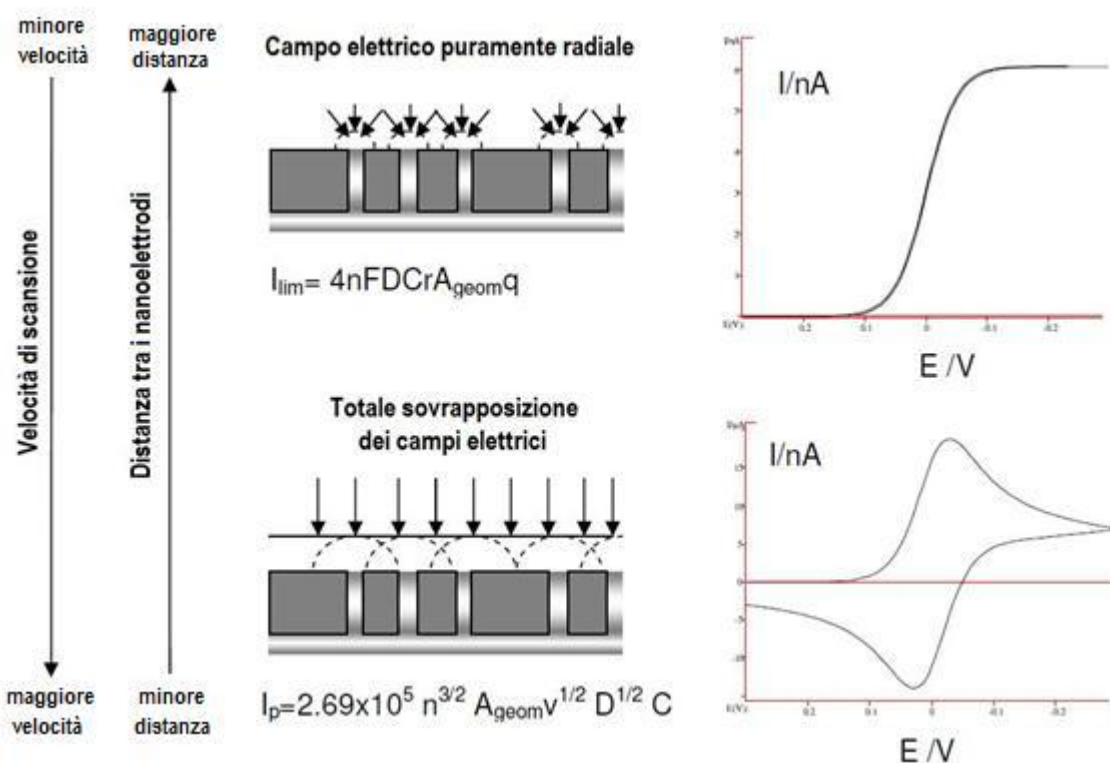


Figura 18 Tipici regimi diffusionali osservati per nanoelettrodi come funzione di velocità di scansione e/o distanza tra nano elettrodi.

Il regime diffusionale normalmente osservato per nanoelettrodi preparati con membrane polimeriche commerciali è quello della totale sovrapposizione dei campi elettrici ad alte velocità di scansione [143] e transizioni da un regime all'altro, in funzione della distanza dei singoli nanoelementi, è dimostrabile mediante l'uso di membrane con caratteristiche diverse [149].

In regime di totale sovrapposizione dei campi elettrici, i nanoelettrodi mostrano un'amplificazione del detection limit elettrochimico rispetto a quello ottenuto per gli elettrodi convenzionali millimetrici. Questo a causa della corrente Faradica ( $I_f$ ) che è proporzionale all'area geometrica totale ( $A_{geom}$ : area dei nanotubi più quella della matrice polimerica che li contiene) mentre la corrente della carica del doppio strato ( $I_c$ ) è proporzionale solo alla superficie dei nanoelettrodi ( $A_{act}$ : area elettrodica attiva). In una voltammetria ciclica la  $I_c$  è la principale componente del rumore di fondo.

L'equazione 1.1 [143,150,151] mette in relazione il rapporto tra la corrente faradica e capacitiva dei nanoelettrodi e rispetto agli elettrodi convenzionali:

$$\frac{I_f}{I_{c_{nanoelett.}}} = \frac{I_f}{I_{c_{conv.}}} * f \quad (1.1)$$

Il rapporto di correnti nei nanoelettrodi è maggiore, se confrontato con un elettrodo convenzionale della stessa area geometrica, di un fattore proporzionale che l'area elettrodica frazionale ( $f$ ), definita come:

$$f = \frac{A_{geom}}{A_{act}} \quad (1.2)$$

Inoltre è importante far presente che utilizzando queste nanostrutture si ottiene un notevole abbassamento delle correnti non faradiche con la possibilità di analisi più accurate quando si utilizzano analiti ad una concentrazione molto ridotta. Questo miglioramento della corrente faradica rispetto a quella capacitiva spiega perché i limiti di rivelazione, utilizzando i nanoelettrodi, possono essere di 2-3 ordini di magnitudo più bassi rispetto a quelli convenzionali [143,152,153].

Un'importante caratteristica dei nanoelettrodi è data dal fatto che la cinetica di elettron-transfer appare più lenta di quella osservata per un singolo elettrodo [143].

Essendo composti da un gran numero di un nanoelementi metallici circondati da un'estesa superficie di materiale isolante (la membrana che li ospita), i nanoelettrodi possono essere considerati come parzialmente bloccati all'interno del materiale polimerico. Secondo il modello pionieristico elaborato da Amatore e collaboratori [154], la risposta in corrente di questo tipo di elettrodi è la stessa di un elettrodo convenzionale con la stessa area geometrica ma con una minore costante di elettron-transfer (definita costante apparente  $k_{app}^0$ ) che diminuisce all'aumentare della copertura del materiale polimerico bloccante. La costante apparente di elettron-transfer è legata a quella vera dalla seguente equazione [154]:

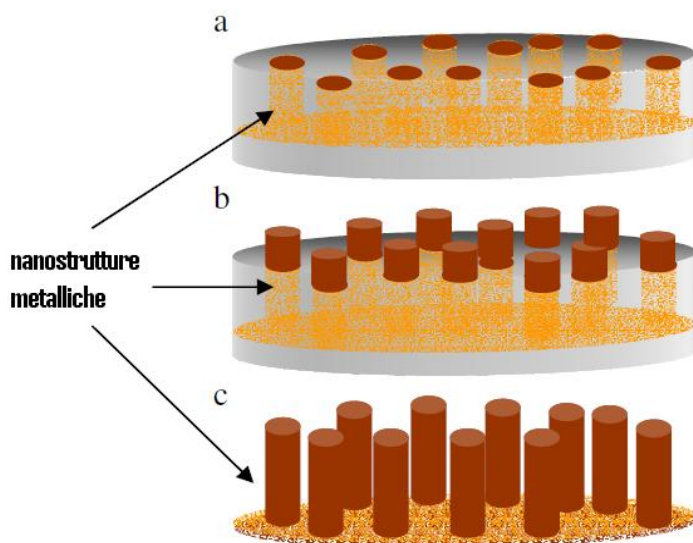
$$k_{app}^0 = k^0 * (1 - \vartheta) = k^0 * f \quad (1.3)$$

dove  $\vartheta$  è la frazione della superficie elettrodica bloccata dal materiale polimerico e  $f$  è la frazione della superficie occupata dai nanoelementi (vedi anche equazione 1.2).

Da un punto di vista meccanicistico, i nanoelettrodi offrono il vantaggio di poter ottenere  $k_{app}^0$  molto grandi [154] che possono essere calcolate trovando sperimentalmente il valore di  $k^0$  e convertito nell'altro applicando l'equazione 1.3 [156,157].

I nanotubi sono preparati depositando l'oro metallico all'interno dei pori del template di policarbonato; la densità dei pori determina il numero dei nanoelettrodi d'oro per  $\text{cm}^2$  e anche la distanza media tra i nanotubi.

Attraverso la rimozione, sia dell'oro metallico depositato su una delle due facce della membrana sia di parte dello stampo di policarbonato, è possibile ottenere nanoelettrodi con differenti geometrie (come illustrato in figura 19) in modo tale che i nanotubi rimangono connessi gli uni agli altri mediante lo strato di oro rimasto sull'altro lato della membrana e in questo modo siano uniformemente contattati con il circuito elettrico esterno.



**Figura 19** Nanoelettrodi con differenti geometrie dovute a diverse rimozioni del template di PC: a) senza rimozione, b) rimozione parziale e c) rimozione totale.

La rimozione del template di polimero si effettua perché in questo modo è possibile aumentare l'area superficiale dei nanoelettrodi così da avere un aumento della corrente faradica, che è proporzionale all'aumento dell'area attiva mentre la corrente capacitiva rimane pressoché inalterata. Si avrà quindi, un passaggio da una struttura bidimensionale piatta, ad una tridimensionale dove i nanotubi d'oro sono parzialmente protesi dalla membrana.

Il metodo utilizzato in questo lavoro di tesi per la sintesi elettrolitica dei nanoelettrodi è quello attuato da Krishnamoorthy e Zoski [158].

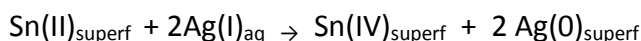
#### 4.3.2 Sintesi dei nanotubi d'oro: Metodo Krishnamoorthy & Zoski

Il metodo considerato da Krishnamoorthy e Zoski [158] prevede l'uso di membrane di polycarbonato 'track-etched' ottenute dalla Poretics, con diametri dei pori dell'ordine di 400nm, ed una densità di pori di  $6 \cdot 10^8$  pori/cm<sup>2</sup>.

La cosiddetta "electroless deposition" opera la deposizione dell'oro mediante reazioni di ossido-riduzione dovute a successive immersioni in tre soluzioni.

Per prima cosa occorre “sensibilizzare” la membrana, immergendola in una soluzione di  $\text{SnCl}_2$ , questa determina la deposizione di  $\text{Sn(II)}$  su tutta la superficie della membrana (sulle pareti dei pori e sulle facce della membrana).

La membrana così attivata è poi immersa in una soluzione di  $\text{AgNO}_3$ , in questo modo sulla superficie avviene un’ossidazione-riduzione, la quale produce nanoscopiche particelle metalliche di argento, secondo la seguente equazione:



Infine la membrana viene immersa in una soluzione di bagno d’oro che presenta un pH pari a 10; l’aggiustamento del pH di tale soluzione si ottiene mediante l’utilizzo di idrogeno carbonato di sodio. Alla soluzione si può aggiungere acido solforico per acidificare o perle di idrossido di sodio per alcalinizzare fino ad arrivare al valore di pH desiderato.

A questo punto avviene una seconda ossido-riduzione, con lo scopo di ottenere nanoparticelle d’oro nei pori della membrana:

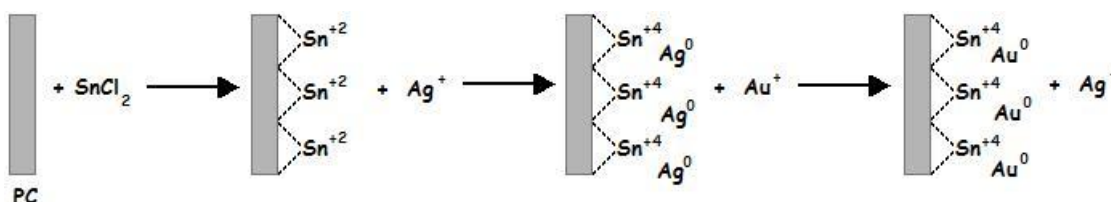
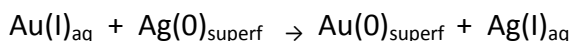
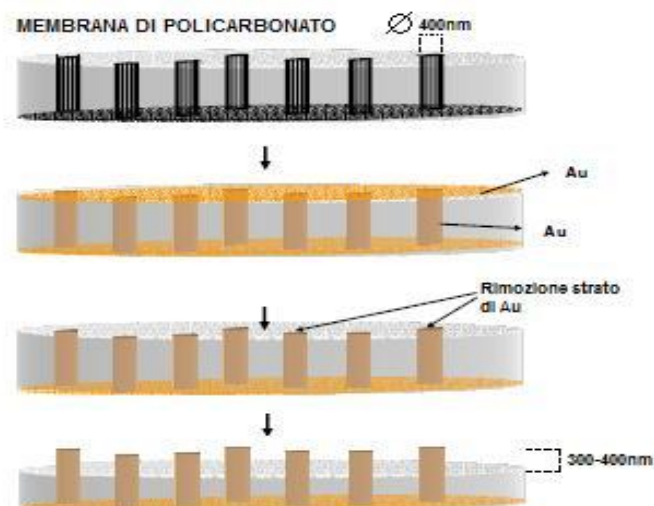


Figura 20 Schema relativo alla formazione delle nanoparticelle d’oro.

Queste nanoparticelle di oro legate alla superficie della membrana, sono buoni autocatalizzatori per la riduzione dell’oro  $\text{Au(I)}$  in  $\text{Au(0)}$ , usando la formaldeide come agente riducente.

Si ha dunque la deposizione dell’oro sulle pareti dei pori, dove crescono i nanotubi e sulla membrana dove si forma un film d’oro. Controllando i tempi d’immersione si può controllare il diametro interno dei nanotubi stessi. Per un riempimento totale dei pori si deve protrarre la procedura per oltre 24 ore.



**Figura 21** Schematizzazione del processo di “electroless plating” usato per preparare le membrane di nanotubi di oro.

Dopo la sintesi la membrana viene sottoposta alla rimozione meccanica dello stato di oro depositato su una delle due facce [159]. Questa operazione viene effettuata utilizzando cotone idrofilo imbevuto di etanolo assoluto. In questo modo si espone il polycarbonato da uno dei due lati così da poter effettuare la parziale rimozione dello stampo utilizzando una miscela di diclorometano e etanolo 1:9. La membrana viene quindi immersa in tale soluzione per diversi tempi di immersione (10 e 30 secondi) e la dissoluzione viene fermata sciacquando con etanolo assoluto. Il template di polycarbonato viene, poi, stabilizzato trattando la membrana così ottenuta in forno a 150° (temperatura appena al disopra della transizione vetrosa del polycarbonato) per 15 minuti.

## Capitolo 5: I liquidi ionici

### 5.1 Generalità

I liquidi ionici (RTILs: room temperature ionic liquids) sono una nuova classe di composti [160] costituiti da coppie di anioni e cationi. Diversamente dai normali composti ionici, essi sono liquidi a temperatura ambiente o a temperature anche molto più basse di quella ambiente. Sono costituiti interamente da ioni e hanno ricevuto particolare interesse in molte aree per le loro proprietà chimico-fisiche [161,162] come l'elevata stabilità termica (non sono infiammabili), la trascurabile tensione di vapore, la relativamente alta conducibilità ionica anche a temperatura ambiente, la buona stabilità elettrochimica e la capacità di solubilizzare materiale inorganico e organico. Inoltre, i liquidi ionici hanno acquistato molta popolarità come alternativa "verde" ai solventi organici volatili, pericolosi e tossici, per essere utilizzati in elettrochimica, nei processi sintetici e separativi.

Dopo la scoperta dei liquidi ionici da parte di Cooper, Sullivan e Wilkes [163], essi sono stati abbondantemente studiati e caratterizzati (grazie alla correlazione tra le loro strutture molecolari) per una loro possibile applicazione in diversi settori. La loro utilità è in funzione del fatto che hanno una differente selettività ed efficienza se paragonata ai solventi organici e acquosi.

I liquidi ionici hanno un basso punto di fusione [161] (tipicamente sotto i 100°C ed è per questo che sono liquidi) ottenuto grazie alla combinazione di una serie di cationi organici con una varietà di anioni. L'elevata possibilità di differenti combinazioni ha portato a considerare questi composti come *designer solvent* [161] sfruttando l'ampia gamma di proprietà chimico-fisiche che ne derivano (le combinazioni sono infatti più di  $10^{14}$ ).

Considerando gli **anioni**, i liquidi ionici possono essere divisi in quattro categorie:

1. sistemi basati su  $\text{AlCl}_3$  e sali organici come  $[\text{bmim}]^+[\text{Cl}]^-$ .
2. sistemi basati su anioni come trifluoruro di boro  $[\text{BF}_4]^-$ , esafluoruro di fosforo  $[\text{PF}_6]^-$  ed esafluoruro di antimonio  $[\text{SbF}_6]^-$ .
3. sistemi basati su anioni come trifluorometilsolfonati  $[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$  e bis(trifluorometilsolfonil)immidi  $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]^-$ .



4. sistemi basati su anioni come alchilsolfati  $[\text{ROSO}_3]^-$  e alchilsolfonati  $[\text{RSO}_3]^-$ .

Il terzo gruppo è quello maggiormente stabile nei confronti delle reazioni chimiche ed elettrochimiche ed è caratterizzato da una bassa volatilità, una elevata viscosità ed una elevata conducibilità. Gli anioni perfluorurati hanno, però, anche alcuni svantaggi come l'elevato costo, la presenza di fluoruro ed eventuali tracce di altri alogenuri contaminanti come cloruro e bromuro che derivano dal processo di preparazione.

Considerando i **cationi**, la loro struttura, generalmente, ha un motivo comune ed è data dal fatto che i sostituenti sull'azoto non sono simmetrici come nel caso degli N,N-dialchilimidazolinio o 1-butil-1-metil-pirrolidinio, fatto questo che induce il carattere amorfo di tali composti.

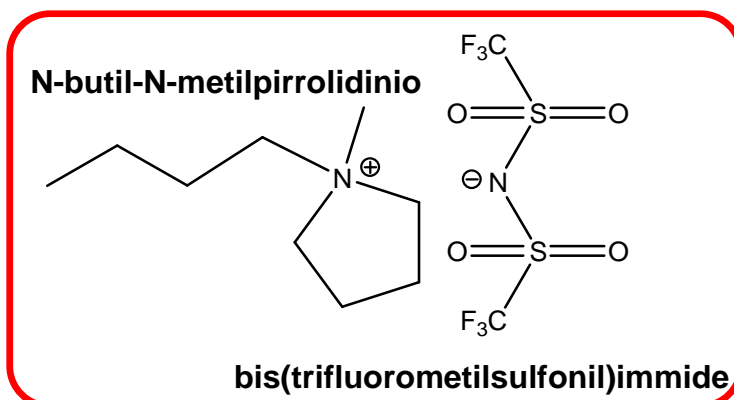
Le proprietà chimico-fisiche dei liquidi ionici, purtroppo, sono inficiate dalla presenza di impurità (come alogeni, acqua e altri solventi) di difficile eliminazione che rimangono in tali composti dalle reazioni di sintesi e che, per questo, necessitano di accurati processi di purificazione.

Dal punto di vista elettrochimico, i liquidi ionici sono buoni conduttori tali da poter essere usati come elettroliti di supporto [164] nelle applicazioni elettrochimiche.

## 5.2 $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$

Le proprietà elettrochimiche del liquido ionico  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$  (N-butil-N-metil-pirrolidinio-bis(trifluorometilsulfonil)immide) usato in questo lavoro sono in dipendenza delle sue proprietà chimico fisiche.

Dal punto di vista della conduttività, il  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$  mostra un'elevata conducibilità, circa  $10^{-3} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$  a temperatura ambiente e circa  $10^{-2} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$  a  $90^\circ\text{C}$ . Alcuni studi



[165] hanno dimostrato che la conduttività di questa classe di liquidi ionici ( $\text{PYR}_{1A}\text{TFSI}$  con A=generica catena idrocarburica fino a 10 C) diminuisce con l'aumentare della

lunghezza della catena carboniosa (in quanto aumenta il peso molecolare di tutto il catione). Inoltre non ci sono rilevanti differenze legate alla geometria della catena laterale a parità di peso molecolare. Infatti, sempre nello stesso studio [165], sono state osservate solo modeste differenze tra la conduttività ( $\sigma$ ) di  $\text{PYR}_{1n4}\text{TFSI}$  e di  $\text{PYR}_{15ec4}\text{TFSI}$  le quali sono rispettivamente  $1.8 \pm 0.1 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$  e  $1.9 \pm 0.1 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Dal punto di vista della viscosità, i liquidi ionici in genere mostrano un comportamento Newtoniano, cioè non subiscono una variazione della viscosità con il variare della forza di taglio applicata, al di sopra dei  $30^\circ\text{C}$ . Sono state riportate solo delle variazioni della viscosità con il variare della catena laterale o con l'introduzione di ramificazioni su quest'ultime. La variazione della viscosità è da imputarsi alla variazione dell'ingombro sterico del catione, correlato alla misura del suo raggio, che aumenta all'aumentare della lunghezza della catena laterale e diminuisce se, a parità di PM la catena è ramificata.

La viscosità è una proprietà fondamentale per lo studio svolto in questo lavoro in quanto il liquido ionico usato come elettrolita di supporto consente di ottenere un polimero nanostrutturato.

La stabilità elettrochimica, valutata attraverso la *linear sweep voltammetry* (LSV) a  $20^\circ\text{C}$ , mostra una finestra di stabilità del liquido ionico  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$ , in un range di potenziale abbastanza ampio, ottenuta dalla composizione di due LSV (catodica e anodica), come il seguente grafico:

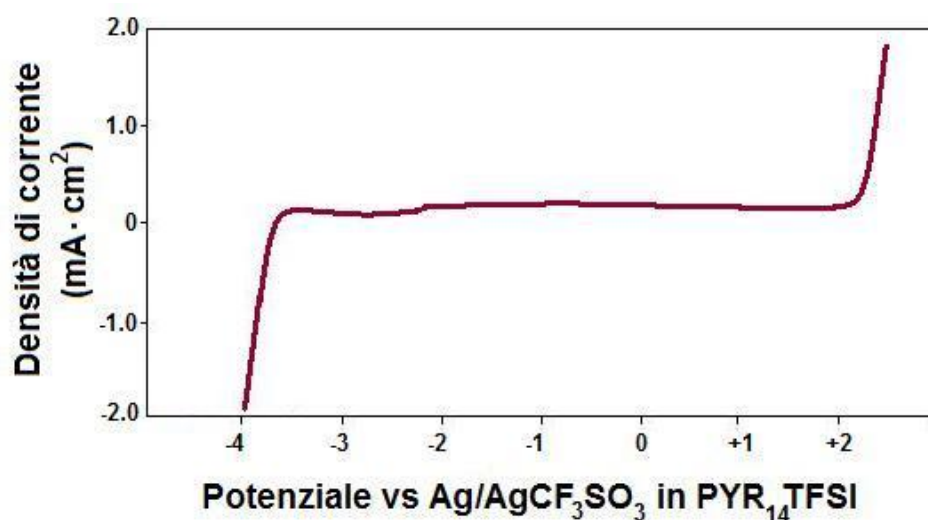
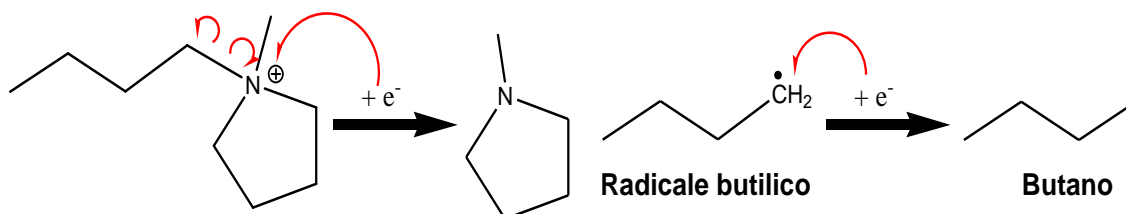


Figura 22. Finestra di stabilità elettrochimica del liquido ionico sottoposto a linear sweep voltammetry

La stabilità catodica dei liquidi ionici è data dal potenziale al quale avviene la riduzione del catione  $\text{PYR}_{14}^+$ . Nel caso particolare del  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$  la riduzione catodica determina probabilmente l'apertura dell'anello di pirrolidinio con il seguente meccanismo:



**N-butyl-N-metil-pirrolidinio**

**N-metilpirrolidina**

**Figura 23.** Processo catodico a carico del catione del liquido ionico  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$ .

Sperimentalmente questa reazione può essere dimostrata dal fatto che si sviluppa gas al catodo.

Le proprietà chimico-fisiche del  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$  sono illustrate nella seguente tabella:

**Tabella 2.** Proprietà chimico-fisiche del liquido ionico  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$ .

Proprietà $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$	Valori
Densità (d)	$1.39 \pm 0.02$ g/ml
Viscosità ( $\eta$ )	$60 \pm 3$ mPas (fluido newtoniano)
Conducibilità ( $\sigma$ )	$1.80 \pm 0.10$ mS·cm <sup>-1</sup> a 30°C
q.tà di H <sub>2</sub> O	<10ppm (altamente idrofobico)
E <sub>decomposizione catodico</sub> vs Ag/AgCF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub>	$+2.10\text{V} \pm 0.01$ a 30°C
E <sub>decomposizione anodico</sub> vs Ag/AgCF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub>	$-3.76\text{V} \pm 0.01$ a 30°C
T <sub>decomposizione</sub>	> 100°C
p.f.	-5°C

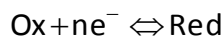
## Capitolo 6: Tecniche elettrochimiche

### 6.1 Voltammetria ciclica (VC)

La voltammetria è un metodo potenziodinamico per lo studio della cinetica elettrochimica basato sull'applicazione di una tensione variabile linearmente nel tempo tra un elettrodo di lavoro ed un elettrodo di riferimento, mentre la corrente risultante viene registrata tra un contro elettrodo e l'elettrodo di lavoro. La scansione del potenziale viene eseguita tra due valori di tensione opportunamente scelti.

La scansione viene effettuata in modo da ottenere una curva a ciclo chiuso che sia in grado di identificare dei picchi di corrente che corrispondono rispettivamente alla scarica anodica e a quella catodica della specie elettroattiva e che sono identificativi della stessa (in questi termini, quindi, la VC rappresenta una tecnica di analisi qualitativa).

Si supponga che la specie elettroattiva si disponga in modo tale da formare uno strato mono molecolare all'interfase dell'elettrodo e che tale specie dia la seguente reazione che obbedisce alla legge di Nernst:



Se si fa variare il potenziale dell'elettrodo linearmente nel tempo con una velocità relativamente bassa, la corrente potrà essere espressa come:

$$i = -n \cdot F \cdot V \frac{dC_{\text{Ox}}}{dt}$$

dove  $V$  = volume della soluzione compresa nello strato sottile

$C_{\text{Ox}}$  = concentrazione della specie ossidante presente all'interfase.

Nel tipico voltammogramma di una specie redox ideale, rappresentato come qui di seguito, la corrente di picco  $i_p$  è data dalla seguente equazione:

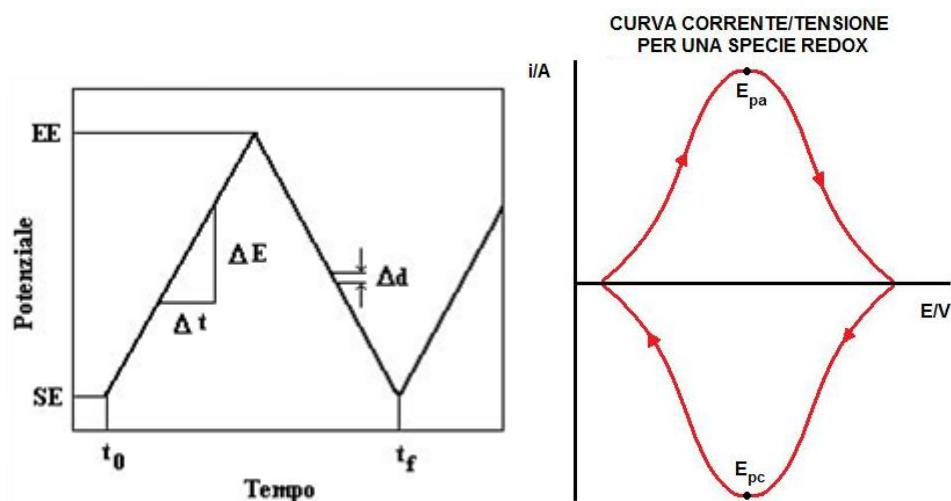


Figura 24 Tipico andamento del potenziale durante una voltammetria ciclica e voltammogramma di una specie redox in condizioni ideali

$$i_p = \frac{n^2 \cdot F^2 \cdot V \cdot C_{Ox}^0 \cdot (-r)}{4RT}$$

dove  $n$  = n° di elettroni scambiati nel processo redox

$F$  = unità Faraday

$V$  = volume di soluzione all'interfase dell'elettrodo

$C_{Ox}^0$  = concentrazione totale del reagente

$r$  = velocità di scansione

$R$  = costante universale dei gas

$T$  = temperatura assoluta

Si deduce, quindi, che  $i_p$  è direttamente proporzionale alla velocità di scansione.

L'andamento della curva voltammetrica, molto spesso, varia nei casi sperimentali considerati. L'origine di tale variazione è legata a fattori di non equilibrio, come fenomeni di riarrangiamento nelle molecole elettroattive che implicano una variazione della struttura superficiale.

Nel caso di elettrodi ricoperti con polimeri conduttori e non-conduttori, l'andamento del voltammogramma è il risultato di fenomeni più complessi che vanno dal movimento degli elettroni degli orbitali molecolari a quello dei controioni solvatanti che contro bilanciano le cariche e al movimento delle stesse catene oligomeriche formate all'interfase elettrodo/elettrolita.

Tutti questi fenomeni contemporaneamente sono responsabili del movimento e trasporto delle cariche nel film polimerico.

## 6.2 Spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS)

L'interfase elettrochimica è una zona di separazione di carica, tra l'elettrodo di lavoro metallico e la soluzione elettrolitica acquosa, dovuta alla variazione della densità di carica alla superficie del metallo il quale induce degli orientamenti preferenziali dei dipoli dell'acqua originando un guscio primario di idratazione sull'elettrodo. L'orientamento dei dipoli dipende dalla carica sul metallo (positiva o negativa) e può variare fino a  $180^\circ$  rispetto alla superficie elettrodica.

L'eccesso di densità di carica sul metallo,  $Q_M$ , deve essere contro bilanciato da un eccesso uguale ed opposto,  $Q_S$ , nella soluzione. Ciò determina, in soluzione, prima uno strato di molecole di solvente orientate e direttamente a contatto con la superficie dell'elettrodo e successivamente un eccesso di ioni che giungono in prossimità dello stesso elettrodo per compensare l'eccesso di carica. La distanza di massimo avvicinamento degli ioni è determinata dal guscio esterno di solvatazione e dallo strato di molecole di solvente a contatto con l'elettrodo. Il luogo dei centri elettrici degli ioni solvatati in prossimità dell'elettrodo è detto *piano esterno dell'Helmholtz* (OHP). L'elettroneutralità verrebbe raggiunta e l'interfase sarebbe formata da due strati ben definiti di carica. Questa semplice situazione, che ha portato ad assegnare all'interfase la definizione di doppio strato, si può descrivere come un condensatore a piatti paralleli a cui corrisponde una caduta lineare di potenziale tra i due strati.

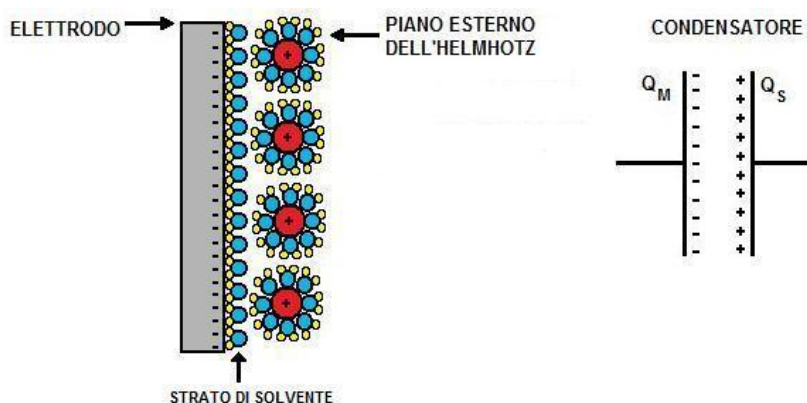


Figura 25 A sinistra, rappresentazione del doppio strato all'interfase elettrodica con formazione del piano esterno dell'Helmholtz (OHP) e, a destra, schematizzazione di quest'ultimo come un condensatore puro.

Un'interfase elettrochimica [166] può essere rappresentata, in termini di circuito elettrico equivalente, dalla combinazione di resistenze e di elementi capacitivi. Tale circuito è il risultato dei seguenti componenti:

- il doppio strato elettrico (un condensatore puro  $C_{dl}$ )
- l'impedenza dovuta ai processi faradici ( $Z_f$ ) identificabile con la resistenza al trasferimento di carica
- la resistenza  $R_s$  che normalmente identifica la caduta ohmica tra l'elettrodo di lavoro e quello di riferimento e che è dovuta alla soluzione elettrolitica.

La combinazione di questi elementi è mostrata di seguito con un tipico circuito equivalente di un'interfase elettrodo/elettrolita:

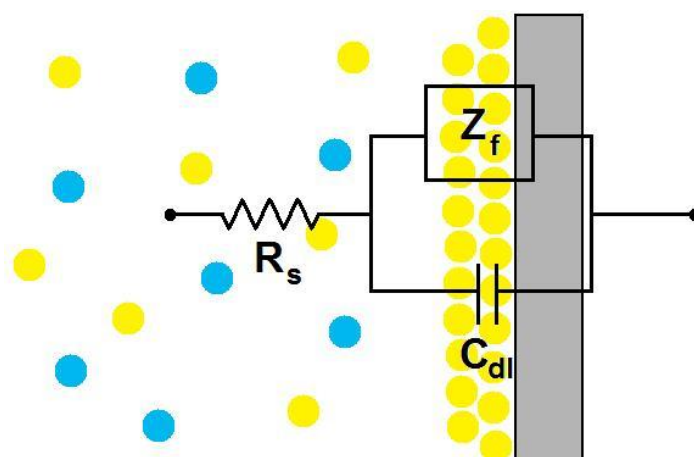


Figura 26 . Rappresentazione del circuito equivalente di un'interfase elettrodo/elettrolita. Si vede come  $R_s$  rappresenti la resistenza della soluzione elettrolitica e  $C_{dl}$  e  $Z_f$  elementi circuitali dipendenti dall'interfase e rispettivamente carica del doppio strato.

dove  $R_s$  è la resistenza della soluzione,  $C_{dl}$  è la capacitance del doppio strato all'interfase con l'elettrodo e  $Z_f$  è l'impedenza che è il risultato di due contributi: la *resistenza al trasferimento di carica* ( $R_{ct}$ ) e l'*impedenza di Warburg* ( $Z_w$ ), come di seguito riportato:

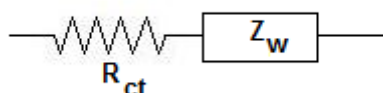
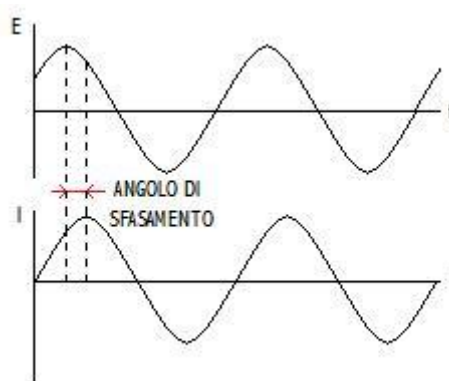


Figura 27 Schematizzazione elettrica dell'impedenza  $Z_f$ . Si vede come questa derivi dai due contributi, uno resistivo, e l'altro di impedenza.

Per una reazione cineticamente favorita,  $R_{ct} \rightarrow 0$  e predomina  $Z_w$ , mentre per reazioni cineticamente sfavorite  $R_{ct} \rightarrow \infty$  e quindi predomina quest'ultima. Tale schematizzazione circuitale prende il nome di *circuito di Randles* [167]. Quando, invece, nel processo elettrochimico vengono coinvolti altri fenomeni, vengono utilizzati modelli circuitali più complessi.

Nell'analisi di impedenza il sistema viene perturbato con un segnale di *input* ondulatorio in un opportuno range di frequenze (sinusoidale) e si registra il segnale di *output* prodotto dal sistema. Se il sistema non è dissipativo, la sua risposta è anch'essa sinusoidale e caratterizzata da uguale frequenza ma differente in intensità ed in angolo di fase.



**Figura 28** Andamento della frequenza del segnale di input (sopra) e di output (sotto). Si vede come questi due segnali abbiano la stessa frequenza, stessa (o diversa) intensità e diversa fase.

Per un generico circuito, la grandezza vettoriale che rappresenta lo sfasamento tra segnale  $E$  e risposta  $I$  di un circuito a una o più componenti è la seguente:

$$Z = \frac{V}{I}$$

Essendo l'impedenza ( $Z$ ) una grandezza vettoriale risulterà opportuno servirsi, per la sua rappresentazione, del formalismo tipico dei numeri complessi:

$$Z = |Z| + (j \sin \omega)$$

dove  $\omega$  è l'angolo di sfasamento e  $j$  è l'unità immaginaria  $j = \sqrt{-1}$ .

L'impedenza risulterà pertanto avere nel piano una componente reale ed una immaginaria, secondo la rappresentazione di Nyquist:



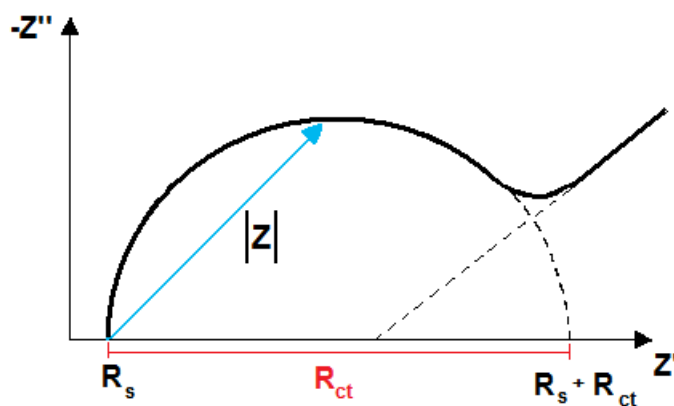


Figura 29 Rappresentazione, secondo Nyquist, dell'impedenza. Sull'asse delle x viene riportata la componente reale, mentre sull'asse delle y viene riportata quella immaginaria.

La EIS [168] nel caso dei sensori impedimetrici da noi assemblati, è stata utilizzata per studiare l' $R_{ct}$  associato alle diverse concentrazioni di  $H_2O_2$ , prodotte dalla catalisi della *glucosio ossidasi* oppure ha fornito informazioni sulla stabilità meccanica dei polimeri depositati sulla superficie metallica del Pt attraverso misure di  $R_{ct}$  nel tempo. L'equazione [169-171] che identifica la relazione tra la concentrazione dell'analita e la resistenza al trasferimento di carica ( $R_{ct}$ ) è la seguente:

$$R_{ct} = R \cdot T \cdot \frac{n^2 \cdot F^2 \cdot A \cdot k_{ct}}{[S]}$$

dove  $R$  = costante dei gas ideali

$F$  = costante di Faraday (96500 C)

$A$  = area superficiale dell'elettrodi (in  $cm^2$ )

$k_{ct}$  = costante di trasferimento di carica che dipende dalla d.d.p.

$[S]$  = concentrazione dell'analita ( $mol/cm^3$ ).

Se tutti i parametri sono costanti, si può ottenere una relazione lineare come la seguente:

$$\frac{1}{R_{ct}} = k \cdot [S]$$

oppure

$$[S] = \frac{1}{R_{ct} \cdot k}$$

$$\text{dove } k = \frac{1}{RT \cdot n^2 \cdot F^2 \cdot A \cdot k_{ct}}$$

Quindi si ha che la resistenza al trasferimento di carica diminuisce all'aumentare della concentrazione dell'analita (S) in soluzione. Ovviamente l'entità di questa diminuzione dipende dal valore del potenziale applicato.

La spettroscopia di impedenza fornisce un metodo efficace per indagare le caratteristiche elettriche della superficie degli elettrodi modificati [172].

Un esempio è fornito dal biosensore sviluppato per la determinazione della collagenasi [173] grazie al cambiamento dell'impedenza causato dalla digestione proteolitica del rivestimento di gelatina su elettrodi di Au. La degradazione enzimatica dello strato proteico produce un rapido aumento del valore di impedenza associato alla riduzione dello spessore dello strato di rivestimento di gelatina fino ad un valore critico che corrisponde alla solubilizzazione di tale strato all'interfase tra elettrodo e soluzione.

### 6.3 Amperometria

Lo studio della variazione della risposta in corrente in funzione del tempo sotto condizioni potenziostatiche è detta cronoamperometria.

Tale tecnica elettrochimica permette di effettuare misure in corrente applicando un valore di potenziale fisso nel tempo così da poter investigare, dal punto di vista cinetico e termodinamico, processi ossido-riduttivi lontani dalla condizione di equilibrio. La corrente registrata è una corrente faradica  $I_f$  ed è dovuta solamente al processo faradico di trasferimento elettronico. Per un elettrodo planare questa è espressa dall'equazione di Cottrell [174]:

$$I_f = \frac{nFA\sqrt{Dc_\infty}}{\sqrt{\pi t}}$$

dove  $I_f$  = corrente faradica

$n$  = n° di elettroni scambiati durante la reazione

$F$  = costante di Faraday (96500C)

$A$  = area della superficie dell'elettrodo

$D$  = coefficiente di diffusione dell'analita

$C_{\infty}$  = concentrazione dell'analita

$t$  = tempo di analisi

Idealmente, il potenziale elettrochimico di una coppia redox dovrebbe essere sufficientemente lontano da quello di un'altra specie così che non vi siano interferenze dell'una nei confronti dell'altra e viceversa. Sfortunatamente nei casi reali questo non succede ed è necessario utilizzare metodiche analitiche che permettano di avere una buona selettività. È possibile discriminare tra le diverse specie presenti in una soluzione grazie alla tecnica amperometrica mediante la scelta dell'opportuno valore del potenziale a cui effettuare l'analisi.

#### 6.4 Voltammetria differenziale ad impulsi (DPV)

L'applicazione di più di uno step di potenziale o di corrente [175-178] rappresenta un'alterazione istantanea di un sistema elettrochimico. L'analisi dell'evoluzione di tale sistema dopo che è avvenuta la perturbazione permette di poter fare delle deduzioni circa le reazioni all'elettrodo e le velocità con cui esse sono avvenute.

Lo step di potenziale è la base della voltammetria pulsata [179,180]. Questa tecnica è stata inizialmente sviluppata per l'elettrodo a goccia di mercurio [181] per sincronizzare l'impulso con la crescita della goccia e per ridurre il contributo della corrente capacitiva registrando la corrente alla fine della vita di ogni singola goccia.

Dopo aver applicato un impulso di potenziale, la corrente capacitiva decade molto rapidamente rispetto a quella faradica per cui, con questa tecnica la corrente viene misurata alla fine dell'impulso. Questo tipo di campionamento ha il vantaggio di apportare un aumento di sensibilità e quindi si possono avere migliori caratteristiche in termini di applicazioni analitiche.

Le tecniche pulsate possono essere di due tipi:

- voltammetria differenziale normale, dove il valore del potenziale di base non cambia e viene impostato su valori dove non si registrano reazioni di trasferimento elettronico. Da questo valore di base si effettuano piccoli impulsi di potenziale di ampiezza crescente a passo costante. La misura della corrente viene effettuata alla fine di ogni impulso che deve durare dai 5 ai 100ms. L'intervallo tra un impulso e un altro può durare dai 2 ai 4 secondi.

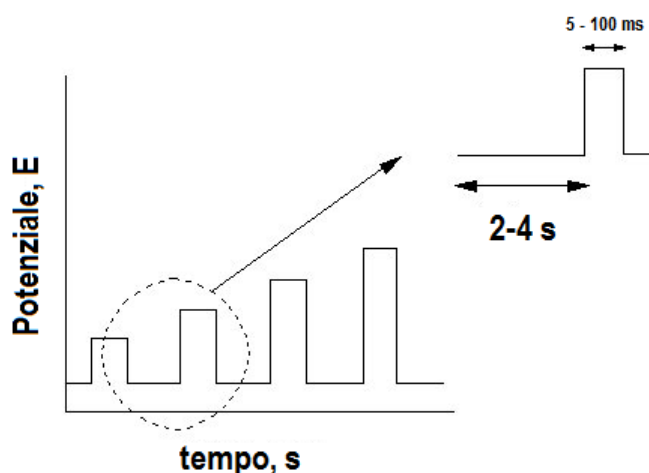


Figura 30 Andamento del potenziale  $V$  nel tempo durante una voltammetria differenziale normale.

- voltammetria differenziale ad impulsi è simile alla voltammetria differenziale normale ma con due importanti differenze: la prima è che il valore del potenziale di base aumenta tra un impulso e il successivo e questo incremento è costante; la seconda è che la corrente viene misurata immediatamente prima l'applicazione dell'impulso e alla fine dello stesso e la differenza tra questi due valori viene registrata. Poiché la DPV è una tecnica differenziale, la risposta è simile alla derivata prima di una voltammetria ciclica convenzionale.

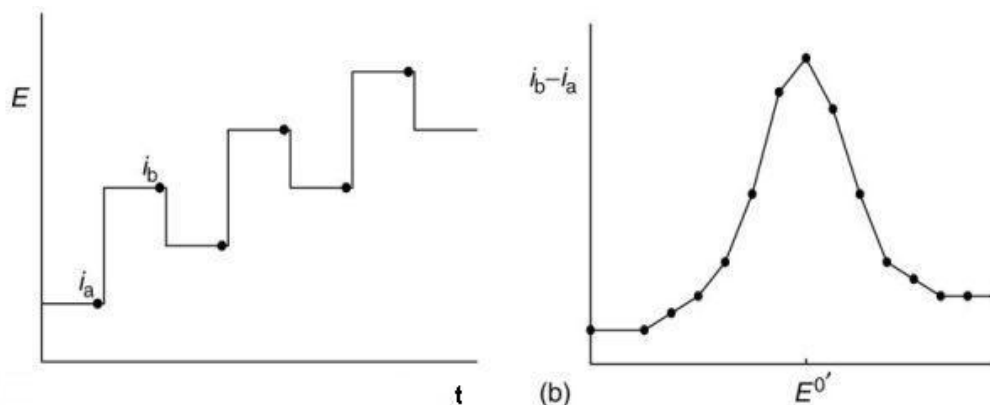


Figura 31 Andamento del potenziale  $V$  in funzione del tempo durante una voltammetria differenziale ad impulsi.

## Capitolo 7. Parte sperimentale

### 7.1 Materiali utilizzati

Sono stati utilizzati i seguenti composti chimici e materiali:

1. Per la pulizia degli elettrodi è stata utilizzata allumina  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Bueheler, Evanston Illinois, USA) in polvere a granulometria variabile di 1, 0.3, 0.05  $\mu\text{m}$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Carlo Erba, 96%).
2. Per le soluzioni tampone sono stati utilizzati il  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (FLUKA, 99%),  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (Sigma Aldrich),  $\text{NaOH}$  in perle (Carlo Erba) e  $\text{HCl}$  al 37% p/p (Carlo Erba).
3. Per la sintesi elettrochimica dei polimeri sono stati utilizzati il pirrolo (Sigma Aldrich, 99%), liquido ionico  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$  (sintetizzato presso i laboratori dell'ENEA), il 3,4-etilediossitiófene (Sigma Aldrich) e il polistirensulfonato sodico (sigma Aldrich PM circa 70,000).
4. Per la funzionalizzazione dei polimeri e l'assemblaggio dei biosensori sono state utilizzate soluzioni acquose di Glucosio Ossidasi di *Aspergillus Niger* (E.C. 1.1.3.4, type VII-S) da 21.200U/g, PEUA (fornito dal laboratorio del Prof. A. Martinelli del Dip. di Chimica dell'Università "Sapienza"), N-idrossi-succinimide (NHS, FLUKA  $\geq 97\%$ ), N-(dimetilammino)propil-N'-etilcarbodiimmide (EDC, FLUKA  $\geq 98$ ).
5. Per la caratterizzazione elettrochimica del polipirrolo, del poli(3,4-etilediossi)tiófene, della matrice polimerica di PEUA-PEDOT, l'uno interpenetrato nell'altro, e delle membrane d'oro sono state utilizzate soluzioni acquose di  $\text{KCl}$  (Sigma Aldrich min.99%), di  $\text{NaCl}$  (Sigma Aldrich min.99%), di  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (Sigma Aldrich) e di  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  (Sigma Aldrich).
6. Per valutare la permselettività del polipirrolo sono state utilizzate soluzioni acquose di acetamminofene (Sigma Aldrich, 99%), di acido ascorbico (Sigma Aldrich, 99%), di acido urico (Sigma Aldrich, 99%),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 volumi) e glucosio (Carlo Erba).

7. Per valutare il poli(3,4-etilendiossi)tiofene come sensore sono state utilizzate soluzioni acquose di acetamminofene (Sigma Aldrich, 99%), acido ascorbico (Sigma Aldrich, 99%), acido caffeico (acido 3,4-diidrossicinnamico Sigma Aldrich), acido urico (Sigma Aldrich, 99%),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 volumi), catecolo (Fluka, >99%), colina cloruro (Fluka, >99%), dopamina (Sigma Aldrich), epinefrina (Sigma Aldrich, min.98%),  $\beta$ -NADH (Sigma Aldrich, sale disodico), serotonina idrocloruro (Sigma Aldrich).
8. Per la sintesi dei nanotubi d'oro:  $\text{SnCl}_2$  (UCB, Aldrich),  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (Acros, 99%)  $\text{CH}_3\text{OH}$  (HPLC grade, Labscan),  $\text{AgNO}_3$  (Aldrich, 99%+),  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28-30%wt (Acros),  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (Merk),  $\text{CH}_2\text{O}$  (Acros),  $\text{Na}_3\text{Au}(\text{SO}_3)_2$  (Ormerse part B, Technic Inc.)  $\text{HNO}_3$  al 25% (Mallinckrodt)
9. Per la caratterizzazione elettrochimica delle membrane d'oro sono state utilizzate soluzioni acquose di KCl (Sigma Aldrich min.99%), di  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (Sigma Aldrich) e di  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  (Sigma Aldrich) idrochinone (HQ, Sigma Aldrich, >99%).

## 7.2 Strumenti

Gli strumenti utilizzati per le varie procedure sperimentali sono stati i seguenti:

1. Grinder polisher (Buehler).
2. Bagno ad ultrasuoni.
3. pHmetro digitale mod.826 mobile, Metrohm.
4. Potenziostato/Galvanostato PGSTAT12 computerizzato Autolab4.9.7.
5. Agitatore magnetico Heidolph MR 3001
6. FRAII-module (100KHz-0.001Hz) computerizzato Autolab4.9.7.
7. Software GPES, FRA e Z-view per il trattamento e il fitting dei dati.
8. Vetreria per la distillazione del pirrolo.
9. SEM per di tipo LEO1450VP (Assing Instruments) l'analisi morfologica dei materiali.
10. Stufa

### 7.3 Pulizia degli elettrodi

La superficie degli elettrodi di lavoro è stata pulita con i seguenti metodi applicati sequenzialmente:

- Per via meccanica mediante trattamento abrasivo mediante l'utilizzo della Grinder polisher utilizzando dischi di carta da 600 gritt e sospensioni di polvere di allumina a granulometria via via decrescente (da 1, 0.3 e 0.05  $\mu\text{m}$ ) per effettuare il così detto "polishing".
- Per via meccanica mediante trattamento in bagno ad ultrasuoni per 10 minuti in  $\text{H}_2\text{O}$  distillata.
- Per via elettrochimica, previo lavaggio con acetone, mediante voltammetria ciclica ( $-0.2\text{V} < E \text{ vs Ag|AgCl} < +1.2\text{V}$ ) in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M per 20 cicli alla velocità di 20mV/s a  $T_{\text{amb}}$ .

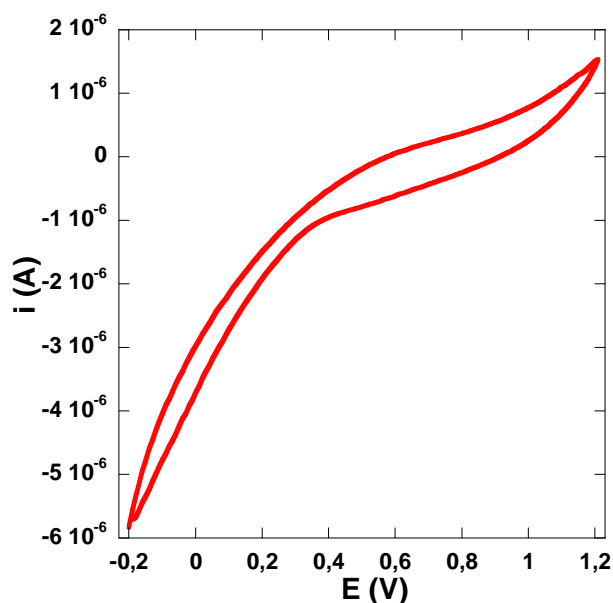


Figura 32 Voltammetria ciclica dell'elettrodo di Pt in  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; potenziale  $-0.2\text{V} < E \text{ vs Ag|AgCl} < +1.2\text{V}$ ; velocità di scansione 20mV/sec; 20 cicli.

L'assenza di picchi anodici o catodici dimostra che non vi sono specie chimiche reattive sulla superficie dell'elettrodo.

## Capitolo 8. Condizioni sperimentali e risultati e discussione

### 8.1 Polipirrolo overossidato: condizioni sperimentali

La purificazione del monomero è stata effettuata mediante distillazione del pirrolo a pressione ordinaria a circa 130°C (p.e.=128°C).

La sintesi del polimero è stata fatta mediante trattamento potenziostatico a impulsi [182,183] in liquido ionico  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$ , il quale consiste nell'applicare un'onda quadra di potenziale fra due valori che consentono, rispettivamente, l'ossidazione del monomero, nel caso del più alto, e la ricostituzione di un fronte di diffusione nel caso del più basso.

La cella elettrochimica è stata allestita con una configurazione a tre elettrodi:  $\text{Pt}|\text{Pirrolo } 0.1\text{M in } \text{PYR}_{14}\text{TFSI}|\text{Pt}||\text{Ag}_{\text{pseudoreference}}$  e il potenziale di lavoro è stato impostato tra due valori quali -1V e +2V (vs  $\text{Ag}_{\text{pseudoref}}$ ) con un tempo di permanenza su ognuno di 0.5 secondi per 40 impulsi di potenziale.

Dopo essere stato elettrosintetizzato, il polimero è stato sottoposto ad un processo elettrochimico di overossidazione in soluzione acquosa 0.1M di tampone fosfato (TF) a pH 7.0 a  $T_{\text{amb}}$  sotto agitazione con il potenziale di lavoro impostato a  $E=+0.8\text{V}$  vs.  $\text{Ag}|\text{AgCl}$  per circa 500 secondi.

Il polipirrolo overossidato così ottenuto è stato caratterizzato mediante voltammetria ciclica, spettroscopia di impedenza elettrochimica e mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) e diffrazione a raggi X a dispersione di energia (EDXD) per indagare le proprietà morfologiche, elettriche, meccaniche e la permselettività nei confronti di  $\text{H}_2\text{O}_2$ , acetamminofene (ACE), acido ascorbico (AA) ed acido urico (AU), tutti alla concentrazione di 4mM in soluzione di tampone fosfato a pH 7.0.

Il potenziale di lavoro per la voltammetria ciclica è stato impostato tra  $-0.3\text{V} < E$  vs  $\text{Ag}|\text{AgCl} > +0.8\text{V}$  con una velocità di 20mV/sec per 2 cicli.

Le misure di impedenza sono state effettuate in condizioni di OCV (Open Circuit Voltage) per le medesime soluzioni usate per l'analisi voltammetrica.

Gli spettri di impedenza sono stati registrati a  $T_{\text{amb}}$  ad un valore di potenziale di circa  $+0.23\text{V} \pm 0.01\text{V}$ , corrispondente a quello di circuito aperto (OCV vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}$ ), nell'intervallo di frequenze compreso tra 10kHz-10mHz. I valori di  $R_{\text{ct}}$  sono stati valutati



per soluzioni di  $K_3[Fe(CN)_6]$  0.01M in KCl 0.2M, in soluzioni di  $H_2O_2$  usando un range di concentrazione compreso tra 0.01mM fino a 10mM.

Il biosensore è stato assemblato mediante trattamento elettrochimico potenziostatico a  $E=+0.6V$  per 600 secondi utilizzando una soluzione di acetato di sodio tamponata a pH 5.2 nella quale è stata disciolta la glucosio ossidasi alla concentrazione di 400U/ml. Il biosensore così assemblato è stato testato con una soluzione di glucosio mediante spettroscopia di impedenza elettrochimica nelle medesime condizioni sperimentali precedentemente descritte.

## 8.2 Polipirrolo overossidato: risultati e discussione

L'elettrosintesi del polipirrolo (PPy), sulla superficie dell'elettrodo di lavoro, coinvolge un certo numero di processi, già discussi in precedenza, come la diffusione del monomero alla superficie dell'elettrodo, la sua ossidazione a radical-catione ad un opportuno valore di potenziale, l'accoppiamento radical-catione/radical-catione, l'ossidazione elettrochimica degli oligomeri formati, la propagazione della catena dovuta alle successive reazioni di accoppiamento e, infine, la precipitazione del catione polimerico sulla superficie elettrodica quando la lunghezza delle catene che lo compongono supera il limite di solubilità specifica.

L'elettrosintesi del polipirrolo con metodo potenziostatico o per voltammetria ciclica ha dei limiti che possono essere facilmente superati con l'uso di una tecnica a impulsi. Tali limitazioni possono essere spiegate facendo delle considerazioni sull'andamento della concentrazione dei monomeri, dei radical cationi monomerici e degli oligomeri più solubili presenti sulla superficie dell'elettrodo durante la sintesi.

Nel caso di una elettrosintesi potenziostatica, sulla superficie dell'elettrodo avviene l'ossidazione del monomero a radical-catione portando alla formazione di un gradiente di concentrazione con conseguente trasporto di massa di quest'ultimo nello strato di diffusione (dalla superficie dell'elettrodo verso la soluzione elettrolitica). Quando si è stabilito un profilo stazionario di diffusione, la concentrazione del monomero alla superficie dell'elettrodo è assimilabile a zero e la limitazione della diffusione determina la massima concentrazione del radical-catione che a questo punto dà il via alla propagazione della catena polimerica. Assumendo che il coefficiente di diffusione del monomero e del radical-catione monomerico non differiscano significativamente, si può pensare che, durante il processo di polimerizzazione, parte dei radical-cationi diffonderanno verso la soluzione elettrolitica così da essere sottratti al processo elettrosintetico.

Nel momento in cui si formano gli oligomeri, l'ulteriore accrescimento della catena è governato dall'ossidazione e dall'accoppiamento di questi ultimi così da portare alla formazione di catene di lunghezza crescente. Ciò determinerà complessivamente una diminuzione del potenziale di ossidazione che è funzione dell'aumento della lunghezza della coniugazione della catena polimerica. Tuttavia, finché gli oligomeri sono di

piccole dimensioni, essi possono sfuggire alla reazione di polimerizzazione poiché possono essere in grado di diffondere verso la soluzione elettrolitica.

Lo stesso discorso vale per la sintesi per voltammetria ciclica, assumendo per contro, che la reazione di trasferimento elettronico sia più rapida rispetto alla velocità di scansione del metodo potenziostatico e quindi il trasferimento di massa verso la superficie dell'elettrodo è principalmente governato dalla diffusione. Inoltre il potenziale è mantenuto, solo per una breve frazione di tempo, al valore che permette l'ossidazione del monomero a radical-catione. Così la concentrazione di suddetto radicale raggiunge un massimo durante ogni ciclo determinando una continua variazione della probabilità di propagazione della catena così da portare alla formazione di un polimero con una morfologia differente.

Un vantaggio della voltammetria ciclica, rispetto alla tecnica potenziostatica, è quello di introdurre nel processo di polimerizzazione una fase nella quale avviene la riduzione delle specie chimiche che via via si formano (dai monomeri, agli oligomeri fino al polimero). Il processo riduttivo implica un passaggio all'elettroneutralità con conseguente perdita degli anioni della soluzione elettrolitica (come contro-ioni del polimero) e acquisto di cationi dalla stessa. Questo movimento di ioni attraverso il film porta a un riarrangiamento delle catene di polimero il quale determina un miglioramento dell'omogeneità dello strato del polimero conduttore.

L'applicazione di una tecnica potenziostatica pulsata permette di superare i problemi legati alla diffusione del monomero alla superficie dell'elettrodo.

Essa consiste nel cambiare istantaneamente il potenziale da +2V a -1V (vs  $Ag_{pseudoref}$ ) e cioè i valori ai quali avviene, rispettivamente, l'ossidazione e la riduzione dei prodotti parzialmente ossidati presenti all'interfase [183].

Il potenziale applicato per l'elettrosintesi del polipirrolo ha un andamento riportato come in figura 33:

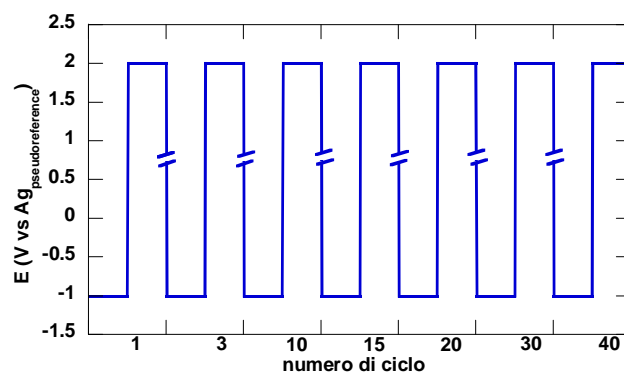


Figura 33 Andamento del potenziale nella tecnica ad impulsi durante la sintesi del polipirrolo in  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$ . Range di potenziale  $-1\text{V} < E \text{ vs Ag} | \text{AgCl} < +2\text{V}$ ; 40 step.

La risposta in corrente è data da due contributi: quello Faradico di ossidazione dei monomeri, prima, e degli oligomeri e polimero, dopo, e la corrente di caricamento del doppio strato all'interfase dell'elettrodo che si comporta come un condensatore.

Il valore della corrente durante il processo sintetico è il seguente:

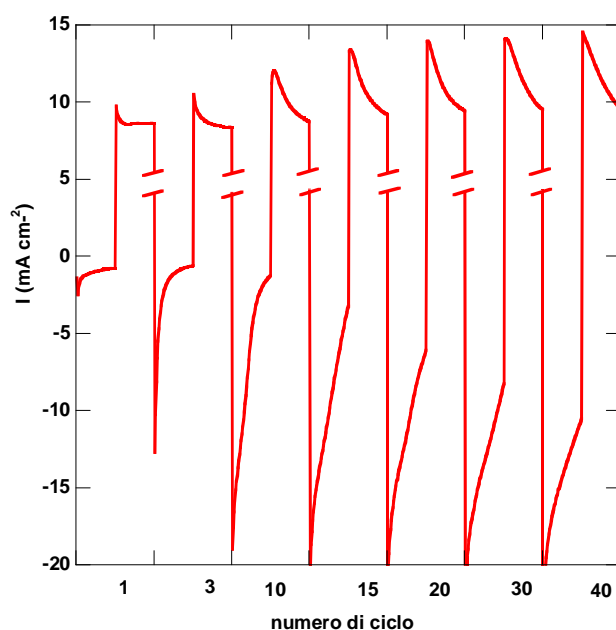


Figura 34 Profilo della corrente ottenuta sottoponendo l'elettrodo di platino ad una scansione di potenziale secondo un onda quadra per la polimerizzazione del pirrolo in liquido ionico  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$ .

Al momento in cui viene fatto partire il primo impulso di potenziale, la concentrazione del monomero, all'interfaccia con elettrodo, è uguale a quella del resto della soluzione. Dopo un primo impulso di potenziale (ossidativo), quest'ultimo viene invertito ad un valore al quale avviene la riduzione delle specie prima ossidate. Durante tale fase, la

concentrazione della specie monomerica (consumata nell'ossidazione) viene ristabilita sulla superficie dell'elettrodo, attraverso un processo diffusivo, contemporaneamente all'allontanamento degli oligomeri dalla suddetta superficie elettrodica.

Il profilo della corrente nei cicli è dovuto alla concomitanza di più fattori:

- corrente ossidativa dei monomeri o delle specie in grado di dare un processo redox a quei potenziali
- carica del doppio strato elettrico

Si può osservare che, tranne per i primissimi cicli in cui possiamo pensare che la corrente sia dovuta principalmente all'ossidazione dei monomeri, in seguito, con il procedere dei cicli, si osserva un progressivo aumento della corrente anodica dovuta anche alla presenza del polimero e quindi ai processi redox a suo carico.

Al contrario, al potenziale di riduzione si osserva una graduale diminuzione della corrente che possiamo spiegare con la graduale scomparsa dei prodotti oligomerici che vengono neutralizzati.

Inoltre si osserva un aumento della caduta ohmica con il procedere della sintesi a causa dell'aumento dello spessore del polimero.

La sintesi del polimero è stata condotta protrando il processo elettrosintetico per 40 impulsi così da ottenere un polimero con uno spessore adeguato alle esigenze di questo lavoro. Infatti, sintesi condotte per 20 e 60 scansioni di potenziale hanno portato rispettivamente a polimeri troppo sottili e poco permselettivi e a polimeri troppo spessi che ostacolano qualsiasi processo diffusivo al loro interno.

Il polipirrolo, dopo la sintesi, è stato overossidato in TF a pH 7.0 per accelerare la trasformazione spontanea dalla forma conduttrice a quella non-conduttrice che è più stabile meccanicamente e quindi più adatta per la realizzazione di un dispositivo di interesse applicativo.

Questa trasformazione è stata effettuata per mezzo di un trattamento potenziostatico a  $E=+0.8V$  vs.  $Ag|AgCl$  fino a raggiungimento di un valore di corrente costante che sta ad indicare la fine del processo di degradazione, come riportato in figura 35.

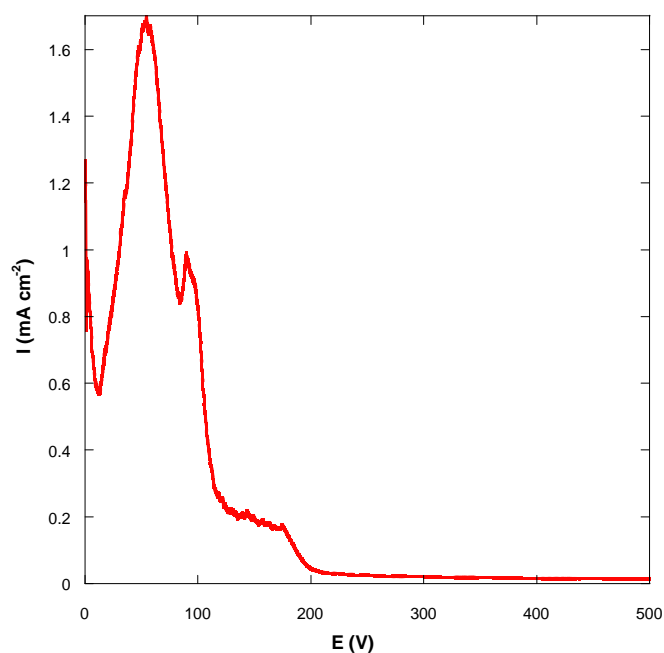


Figura 35 Andamento dell'overossidazione del polipirrolo con tecnica potenziostatica. E (vs Ag|AgCl)=+0.6V per t=500s.

Oltre tale situazione la membrana si presenta elettrochimicamente inerte.

È stato studiato anche il comportamento elettrochimico del PPy tramite voltammetria ciclica nel solo liquido ionico libero dal monomero, come mostrato in figura 36.

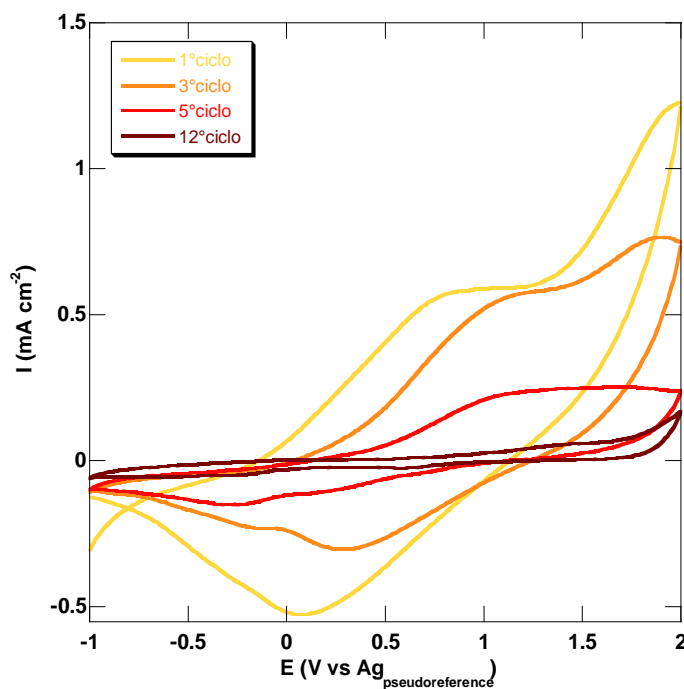


Figura 36 Voltammetria ciclica del polipirrolo non overossidato in liquido ionico  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$  libero dal monomero. Range di potenziale  $-1\text{V} < E_{\text{Ag pseudoreference}} < +2\text{V}$ ; velocità di scansione 50mV/s per 20 cicli.

Nel primo ciclo si osservano due picchi principali attribuibili alla coppia redox del polimero (+0.8V e +0.1V vs  $Ag_{pseudoref}$ ) e che vengono accompagnati dai movimenti dei controioni che bilanciano le cariche situate sullo scheletro del polimero. Con il crescere del numero di cicli si osserva una perdita di tale attività elettrochimica imputabile al fatto che proprio tale movimento degli ioni, pirrolidinio e sulfonilimide, è irreversibile presumibilmente a causa delle loro notevoli dimensioni. A seguito di tale impedimento, si verifica la perdita di attività elettrochimica segnando, di fatto, la transizione del polipirrolo da uno stato di conduttore a uno di non-conduttore già intorno al 10° ciclo. Da questo punto in poi si registra uno stato di inerzia elettrochimica.

Come detto in precedenza, le membrane utilizzate sono costituite da polipirrolo overossidato (OPPy), ed è su questo materiale che sono state fatte tutte le caratterizzazioni successive.

Di seguito, in figura 37, viene riportato il grafico nel quale sono stati registrati gli spettri di impedenza del polipirrolo (rispetto a un noto probe elettrochimico come il potassio ferricianuro) che ha subito il trattamento di overossidazione a tempi diversi [184-187] e rispettivamente per 100, 200, 300 e 500 secondi. Dal grafico appare evidente il cambiamento della resistenza al trasferimento di carica dello ione  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  sulla superficie del polimero. Questo è imputabile alla presenza dei gruppi carbonilici su alcuni anelli aromatici della catena polimerica (vedi figura 7) tanto da conferire a tutta la membrana proprietà ione-selettive. Infatti con il procedere dell'overossidazione, lo ione  $[Fe(CN)_6]^{3-}$  mostra di avere una progressiva diminuzione della capacità a scaricarsi sulla superficie elettrodica come dimostrato dai valori di  $R_{ct}$  riportati nel grafico in figura 37.

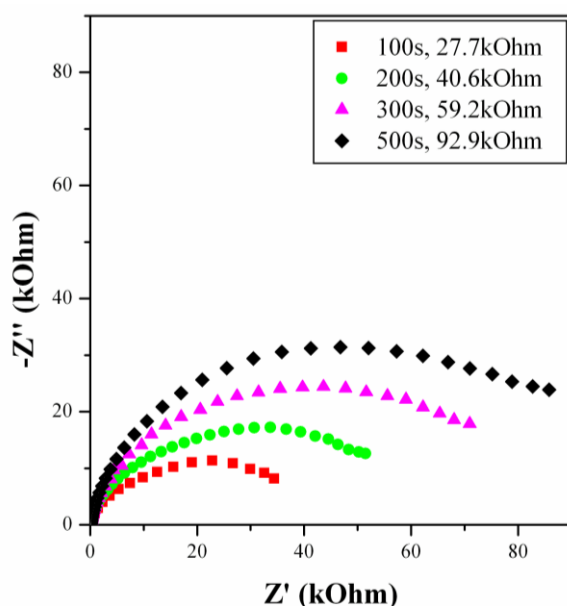


Figura 37 Spettroscopia di impedenza elettrochimica dell'elettrodo modificato con il polimero in soluzione di  $K_3[Fe(CN)_6]$  0.01M in KCl 0.2M a diversi gradi di overossidazione. Condizioni di circuito aperto. Range di frequenze: 10kHz-0.01Hz. Nella legenda viene riportato il valore di  $R_{ct}$ .

La caratterizzazione elettrochimica del polipirrolo a diversi gradi di overossidazione, è stata effettuata anche con  $H_2O_2$  (in figura 38) per valutare la resistenza al trasferimento di carica di tale analita quando il polimero subisce il trattamento ossidativo per tempi diversi e rispettivamente per 25, 100, 200, 300 e 500 secondi.

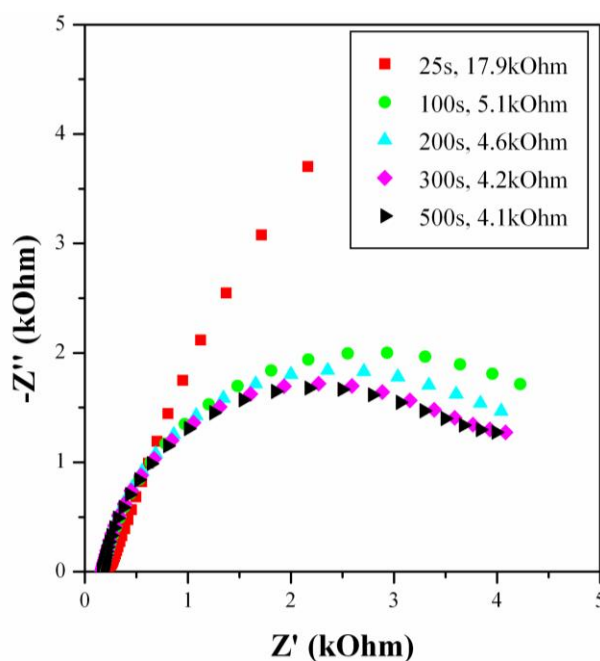


Figura 38 Spettro di impedenza dell'elettrodo modificato con il polimero in una soluzione di  $H_2O_2$  5mM in tampone fosfato 0.1M durante il processo di overossidazione. Condizioni di circuito aperto. Range di frequenze: 10kHz-0.01Hz. Nella legenda viene riportato il valore di  $R_{ct}$  associato ad ogni spettro.



Dal grafico in figura 38 si evidenzia la netta differenza delle proprietà dell'interfase elettrochimica (rappresentata dalla membrana polimerica) nei confronti dell'analita  $\text{H}_2\text{O}_2$  in quanto fin tanto che la membrana polimerica mantiene le sue proprietà conduttive, il fenomeno predominante all'interfase è rappresentato dalla diffusione dell'analita alla superficie elettrodica. Infatti, finché il polimero è conduttore,  $\text{H}_2\text{O}_2$  non incontra nessuna difficoltà a scaricarsi all'interfase. Mentre, già dopo pochi secondi di trattamento ossidativo, si evidenziano le caratteristiche tipiche dei materiali non-conduttori, mediante la formazione, nel diagramma di Nyquist, del semicerchio tipico del fenomeno della resistenza al trasferimento di carica. Inoltre, appare evidente che le proprietà elettrochimiche del polimero raggiungono una costanza per un tempo di trattamento ossidativo che va dai 300 ai 500 secondi (come già evidenziato dal grafico in figura 35, relativo all'overossidazione stessa).

Per lo studio della permselectività sono state valutate le risposte in voltammetria ciclica dei principali interferenti presenti nei liquidi biologici, come acetaminofene, acido ascorbico e acido urico, alle concentrazioni di 4mM (dieci volte superiori a quelle fisiologiche).

I risultati ottenuti sono stati poi messi a confronto con quelli ottenuti per un elettrodo di Pt non modificato e testato nelle stesse condizioni sperimentali.

I voltammogrammi registrati sono i seguenti:

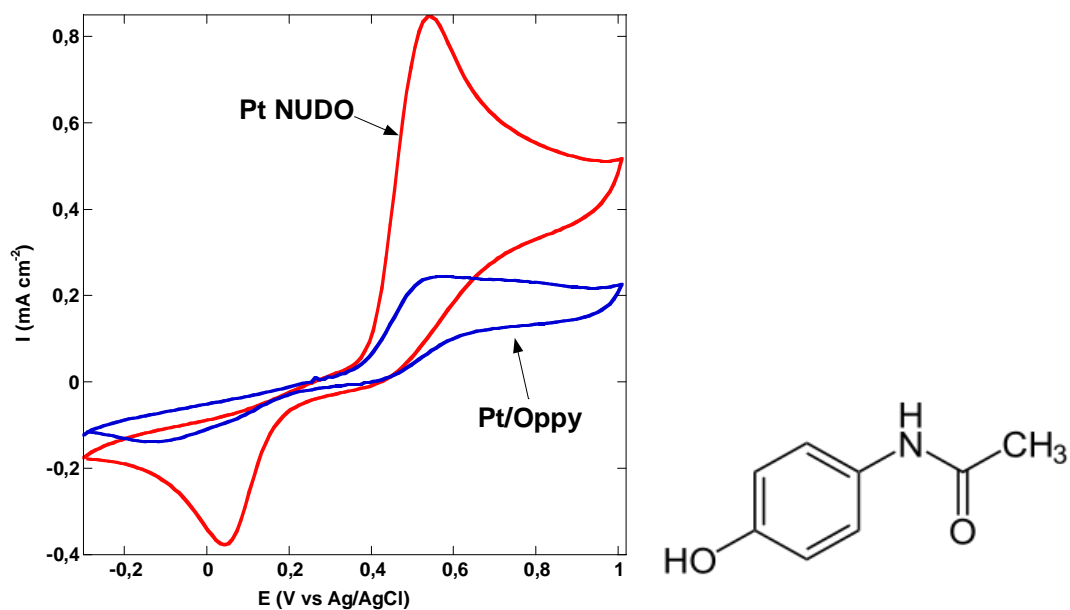


Figura 39 Voltammetria ciclica dell'elettrodo modificato con OPpy in una soluzione di acetaminofene 4mM. Range di potenziale  $-0.3V < E \text{ vs Ag} | \text{AgCl} < +1.0V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 2 cicli.

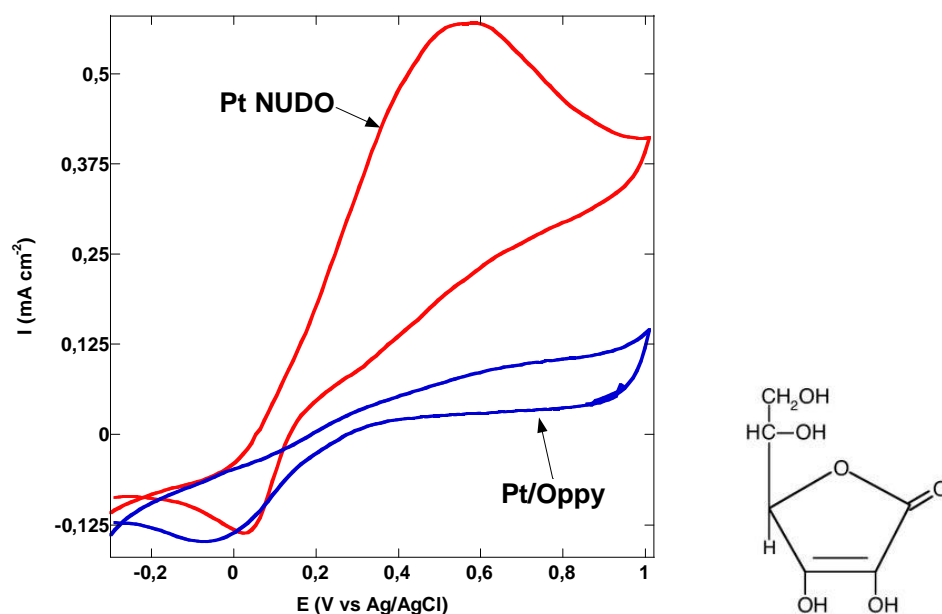


Figura 40 Voltammetria ciclica dell'elettrodo modificato con OPpy in una soluzione di acido ascorbico 4mM. Range di potenziale  $-0.3V < E \text{ vs Ag} | \text{AgCl} < +1.0V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 2 cicli.

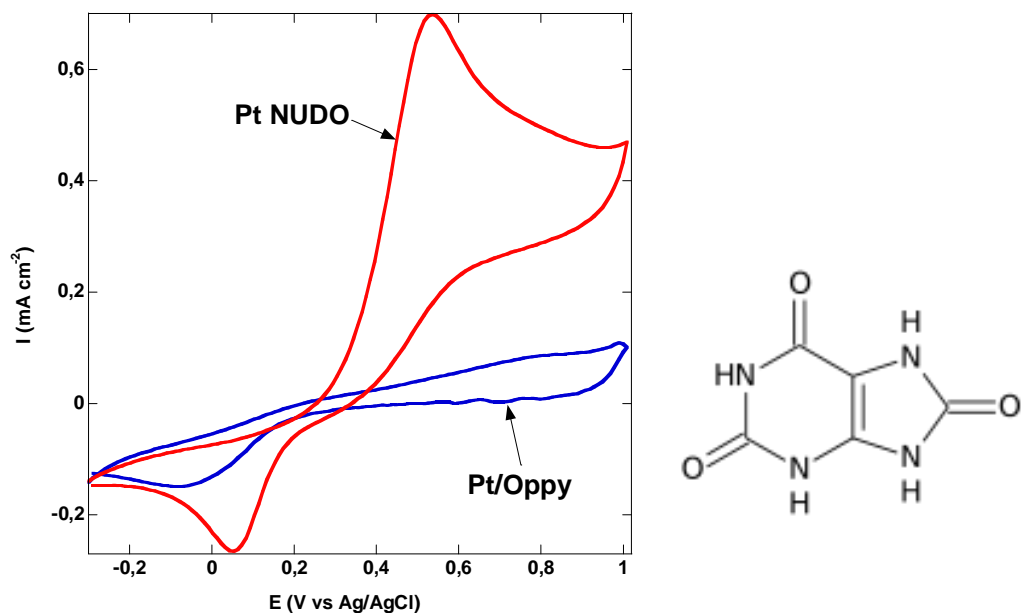


Figura 41 Voltammetria ciclica dell'elettrodo modificato con OPpy in una soluzione di acido urico 4mM. Range di potenziale  $-0.3V < E \text{ vs Ag|AgCl} < +1.0V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 2 cicli.

Come si può osservare dai grafici, l'OPpy mostra un'ottima efficienza nell'abbattere il segnale della scarica redox dei vari interferenti.

La seguente tabella mostra la percentuale di abbattimento (A(%)) del suddetto segnale:

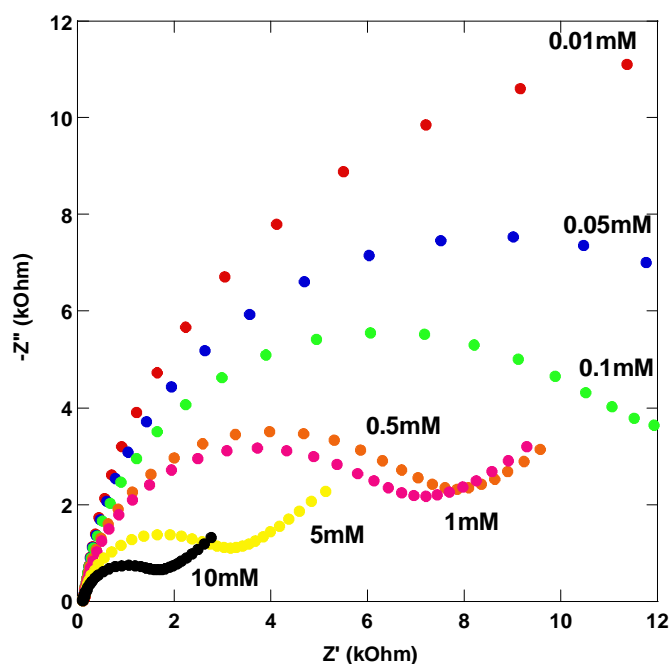
Tabella 3. Valore dell'abbattimento della corrente dell'elettrodo modificato con OPpy rispetto a quello non modificato

Interferenti	Densità di corrente del Pt non modificato ( $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	Densità di corrente del Pt modificato con OPpy ( $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	Abbattimento A(%)
Acetamminofene	843.7	243.71	71.1
Acido Ascorbico	570.5	90.1	84.2
Acido Urico	700.1	40.8	94.2

Calcolato nel seguente modo:

$$A(\%) = \frac{I_{\text{Pt/OPpy}} - I_{\text{Pt}}}{I_{\text{Pt}}} \cdot 100$$

Allo scopo di verificare in via preliminare, la possibilità di assemblare un biosensore impedimetrico, cioè che consenta di mettere in relazione la concentrazione di glucosio, in campioni di interesse analitico, con la variazione di impedenza del sistema (o meglio con la variazione della sua  $R_{ct}$ ), è stata studiata la sua risposta elettrochimica in presenza di  $H_2O_2$  a diverse concentrazioni in un range compreso tra 0.01mM e 10mM. I diagrammi di Nyquist relativi a tali analisi sono i seguenti:



**Figura 42** Spettroscopia d'impedenza elettrochimica dell'elettrodo modificato con OPPy in soluzione di  $H_2O_2$  a concentrazioni crescenti. Condizioni di circuito aperto. Range di frequenza: 10kHz-0.01Hz; intervallo di concentrazione di  $H_2O_2$  compreso tra 0.01mM e 10mM.

Dal grafico in figura 42 si nota come all'aumentare della concentrazione di  $H_2O_2$ , si ottiene una diminuzione della resistenza al trasferimento di carica corrispondente al diametro dei semicerchi che risulta essere inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita stesso (vedi pag.66).

La curva relativa alla variazione del reciproco dell' $R_{ct}$  di  $H_2O_2$  in funzione dell'aumento della sua concentrazione è riportata in figura 43:

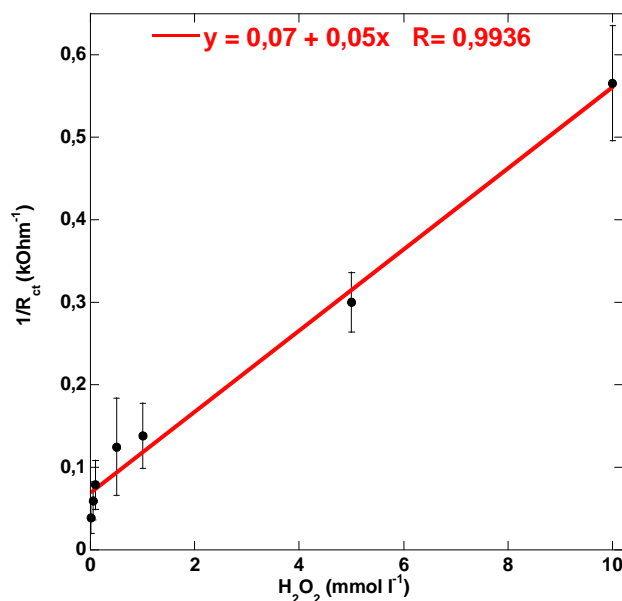


Figura 43 Retta di taratura del sensore impedimetrico ottenuto modificando la superficie del Pt con OPPy rispetto all'acqua ossigenata. Si riporta il reciproco dell' $R_{ct}$  in funzione della concentrazione di  $H_2O_2$ .

La deviazione standard, riportata nel grafico in figura 43, è stata calcolata per 5 campioni di OPPy sintetizzati e testati nelle medesime condizioni sperimentali. Le caratteristiche del metodo vengono riassunte nella seguente tabella:

Tabella 4 Tabella riassuntiva delle caratteristiche del metodo impedimetrico per la determinazione di  $H_2O_2$  con Pt/OPPy.

Metodo	Range di linearità	LOD	LOQ	Sensibilità	Durata	RSD (%)	Equazione
EIS	0.01-10mmol/l	0.01mmol/l	0.01mmol/l	0.05 l/ kΩ mmol	100''	10.1	$y=0.07+0.05x$
Utilità	Campo clinico per la determinazione del grado di stress ossidativo responsabile dell'invecchiamento e deterioramento cellulare						

Il risultato ottenuto permette di poter essere certi della riproducibilità delle caratteristiche morfologiche, meccaniche ed elettrochimiche del polipirrolo overossidato.

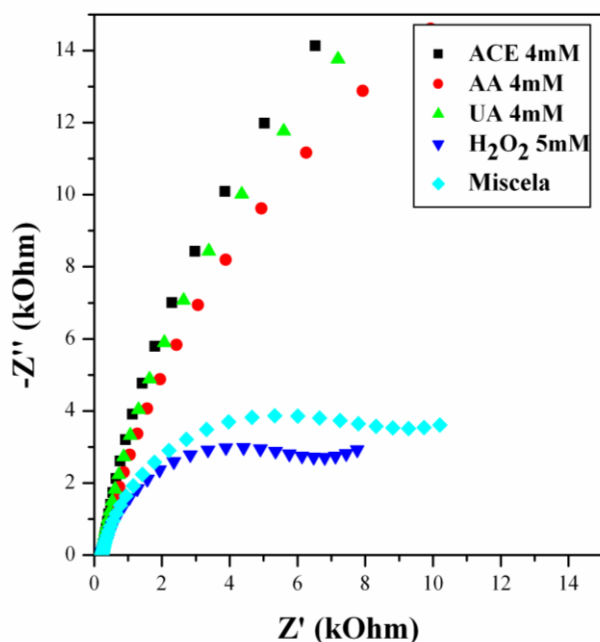
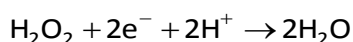


Figura 44 Spettroscopia di impedenza elettrochimica dell'elettrodo modificato con OPPy in soluzioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dei tre interferenti quali acetaminofene, acido ascorbico e acido urico e della miscela dei quattro composti. Condizioni di circuito aperto. Range di frequenza: 10kHz-0.01Hz.

La permselectività del polipirrolo overossidato è stata studiata anche per mezzo della spettroscopia di impedenza elettrochimica effettuata in condizioni di circuito aperto (OCV) e mostrata nel diagramma di Nyquist in figura 44. Nel grafico sono state riportate le resistenze al trasferimento di carica per una soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, per le soluzioni di ogni interferente e per una soluzione che non è altro che la miscela dei quattro composti (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ACE, AA, AU). Le soluzioni dei tre interferenti mostrano una resistenza al trasferimento di carica infinita, sulla superficie del Pt modificata dal polipirrolo overossidato, in quanto nessuna delle tre curve relative chiude a semicerchio sull'asse X dell'impedenza reale. Inoltre la resistenza al trasferimento di carica della sola H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è paragonabile a quella ottenuta per la miscela dei quattro analiti per cui si può dedurre che le condizioni sperimentali consentono di determinare efficacemente e selettivamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> anche quando sono presenti i più comuni interferenti elettroattivi dei liquidi biologici. Nelle condizioni sperimentali dell'OCV si registra un valore di potenziale pari a +0.23V al quale si verifica la reazione di riduzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:



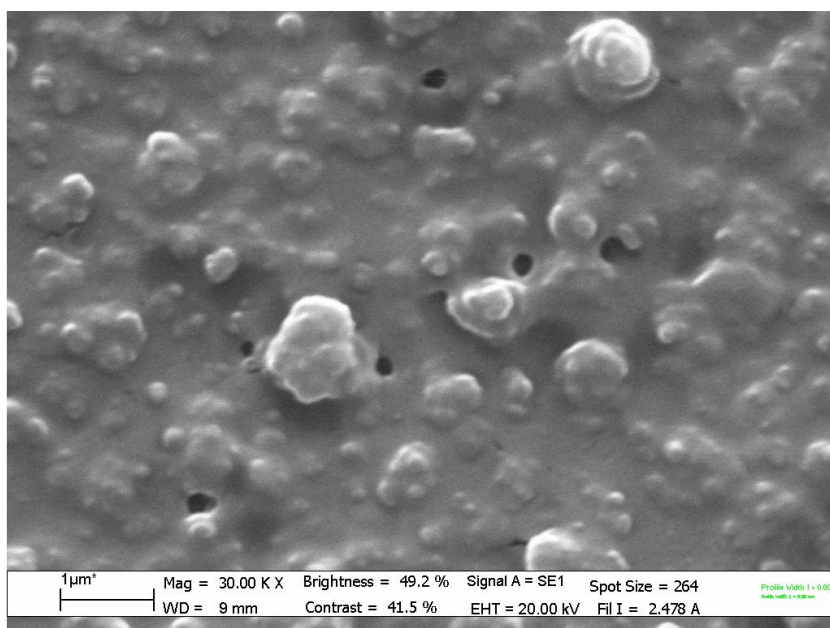
Il fatto che si verifichi la riduzione e non l'ossidazione (che invece porterebbe alla formazione di  $O_2$ ) è un ulteriore vantaggio della metodologia sperimentale in quanto l'ossigeno eventualmente prodotto si adsorbirebbe in modo irreversibile sulla superficie elettrodica facendone, così, diminuire la performance.

Lo studio della morfologia dei campioni di PPy e OPPy è stato effettuato mediante analisi SEM.

Il polimero è stato quindi analizzato durante le varie fasi analitiche: appena sintetizzato, dopo l'overossidazione e, per finire, dopo essere stato utilizzato nelle varie analisi elettrochimiche e, cioè, dopo essere stato sottoposto a vari stress derivanti dai processi diffusivi delle specie chimiche all'interno del materiale polimerico stesso.

Qui di seguito vengono riportate le immagini ottenute:

a. SEM del polipirrolo non overossidato subito dopo la sintesi in liquido ionico con tecnica potenziostatica pulsata.

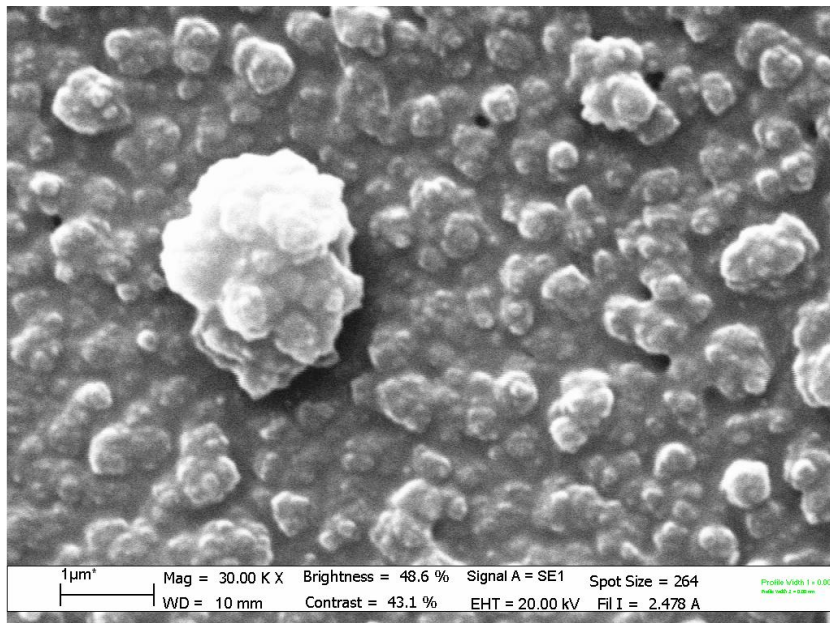


**Figura 45 SEM del polipirrolo appena sintetizzato.**

La struttura del polimero in figura 45 presenta dei centri di nucleazione sui quali avviene l'accrescimento del polimero. Tali centri sono originati dall'iniziale ossidazione del monomero che si aggancia sulla superficie del Pt e che dà via alla reazione di allungamento della catena per formazione del radical catione oligomerico. Durante la sintesi, nei primi impulsi di potenziale, i monomeri occupano tutti i siti disponibili della

superficie dell'elettrodo di Pt prima di dare il via all'accrescimento della catena ed è per questo che si osserva una conformazione globulare compatta di dimensioni nanometriche.

**b. SEM del polipirrolo overossidato**



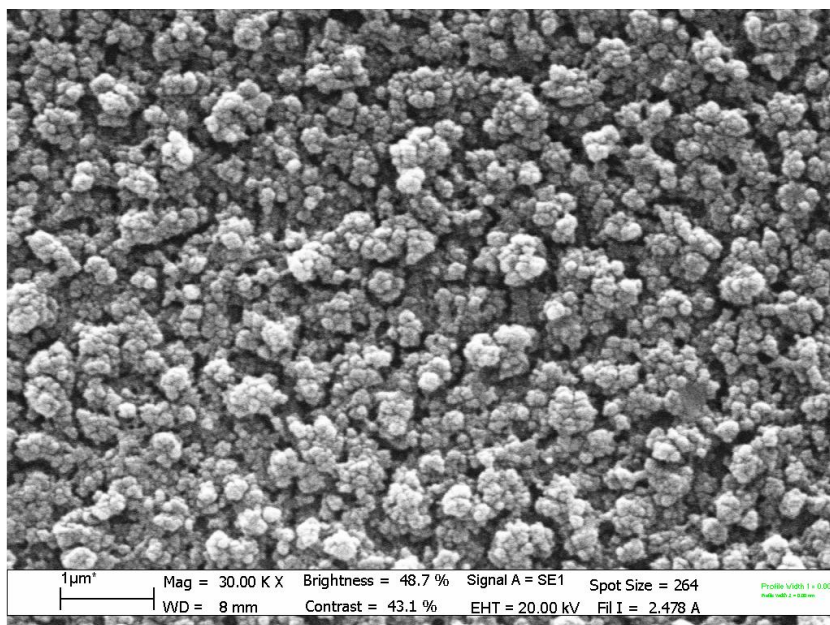
**Figura 46 SEM del polipirrolo dopo overossidazione.**

Dall'analisi SEM in figura 46 si evidenzia che l'overossidazione del polipirrolo causa un parziale sgretolamento della superficie con l'evidenziazione della struttura globulare ancora saldamente coesa alla superficie metallica.

Il polimero oltre ad essere ben aderente al Pt, non mostra punti di rottura a seguito del trattamento elettrochimico ossidativo.

**c. SEM del polipirrolo overossidato dopo le analisi voltammetriche, amperometriche e impedimetriche**





**Figura 47 SEM del polipirrolo dopo overossidazione e dopo prolungati trattamenti elettrochimici.**

In figura 47 è evidente lo sgretolamento del materiale a seguito di un prolungato lavoro elettrochimico anche se viene mantenuta ancora una buona aderenza al supporto metallico e una totale ricopertura dello stesso.

Qui di seguito si riportano i dati sperimentali ottenuti per mezzo di un'analisi effettuata all'EDXD:

**Tabella 5. Composizione elementare dei due polimeri (PPy e OPPy) effettuata tramite EDXD**

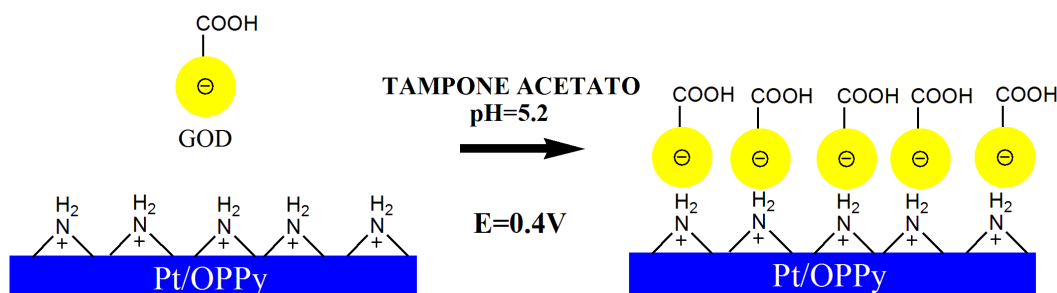
Elemento	C	N	O	F	S
<b>Campione di PPy</b>	45.95	12.55	7.51	35.06	2.93
Elemento	C	N	O	F	S
<b>Campione di OPPy</b>	53.32	18.84	19.28	8.50	0.07

La diminuzione del fluoro, del liquido ionico, indica che il polimero, mano a mano che viene fatto lavorare, tende a liberare gli anioni residui fino a una eliminazione quasi totale rispetto al contenuto iniziale (8% contro il 35%).

Una volta terminato lo studio per la caratterizzazione preliminare, il polipirrolo overossidato è stato funzionalizzato con la glucosio ossidasi (GOD) al fine di valutarne le proprietà elettrochimiche come biosensore. La funzionalizzazione è stata effettuata mediante adsorbimento elettrochimico [188,189]. L'enzima si trova disciolto in una soluzione di tampone acetato a pH 5.2, cioè un valore superiore al punto isoelettrico

dell'enzima (pI 4.2) in modo tale da avere su tutta la molecola proteica, una carica netta negativa. In questo modo, applicando un potenziale positivo alla superficie elettrodica modificata con il polipirrolo ( $E=+0.4V$  vs.  $Ag|AgCl$ ) si ha elettrodeposizione dell'enzima sul polimero stesso.

L'elettrodeposizione può essere schematizzata come segue in figura 48:



**Figura 48** Reazione di elettrodeposizione sull'elettrodo di Pt modificato con OPpy; potenziale  $E=+0.4V$  vs  $Ag|AgCl$  per  $t=600s$ .

Il polipirrolo overossidato gioca un ruolo cruciale come substrato per l'adsorbimento elettrochimico della *glucosio ossidasi*, contribuendo alla funzionalità e alla stabilità del biosensore finale.

Come descritto in precedenza questa procedura è particolarmente rapida e pulita in quanto non vengono utilizzati altri reattivi, se non l'enzima stesso, in modo da evitare l'introduzione di possibili interferenze sulla superficie elettrodica che possano disturbare l'attività della *glucosio ossidasi*.

Il biosensore così assemblato è stato caratterizzato per via impedimetrica in quanto il tipo di polimero e il tipo di immobilizzazione lo rendono adatto a questo tipo di tecnica, come visto in precedenza.

Le condizioni sperimentali alle quali è stato testato (OCV, in TF 0.1M, a frequenze tra 10kHz e 1Hz) hanno permesso di indagare l'entità della resistenza al trasferimento di carica, quando nella cella elettrochimica vengono effettuate delle aggiunte di una soluzione di glucosio a concentrazione via via crescente. L'andamento di tale risposta è illustrato nel seguente grafico in figura 49:

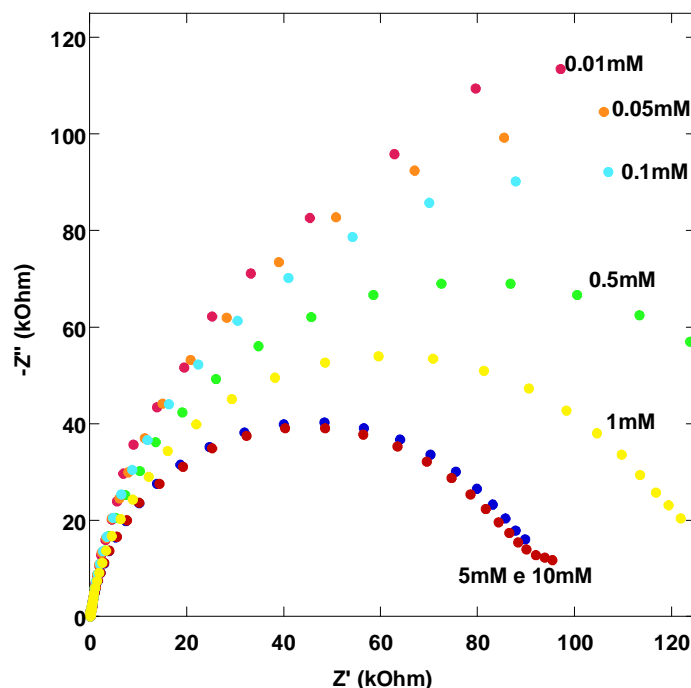


Figura 49 Spettro di impedenza per il biosensore Pt-OPPy-GOD con soluzioni di glucosio a concentrazione crescente; potenziale OCV vs Ag|AgCl; intervallo di frequenze da 10kHz a 1Hz; range di concentrazione 0.01-10mM.

dove si vede la diminuzione della  $R_{ct}$ , ad ogni aggiunta di glucosio a differente concentrazione. Si noti come non vi sia differenza di  $R_{ct}$  tra 5mM e 10mM in quanto il primo valore di concentrazione è quello che determina la saturazione dell'enzima.

Tale saturazione è collegabile a una non completa funzionalizzazione del materiale di supporto. La concentrazione dell'enzima sul polimero è, infatti, un fattore cruciale che richiede, in tal senso, dei miglioramenti ottenibili con uno studio sulle condizioni in cui tale immobilizzazione viene effettuata.

Graficando il valore del reciproco dell' $R_{ct}$ , in funzione della concentrazione del glucosio, si ottiene un andamento del seguente tipo e riportato in figura 50:

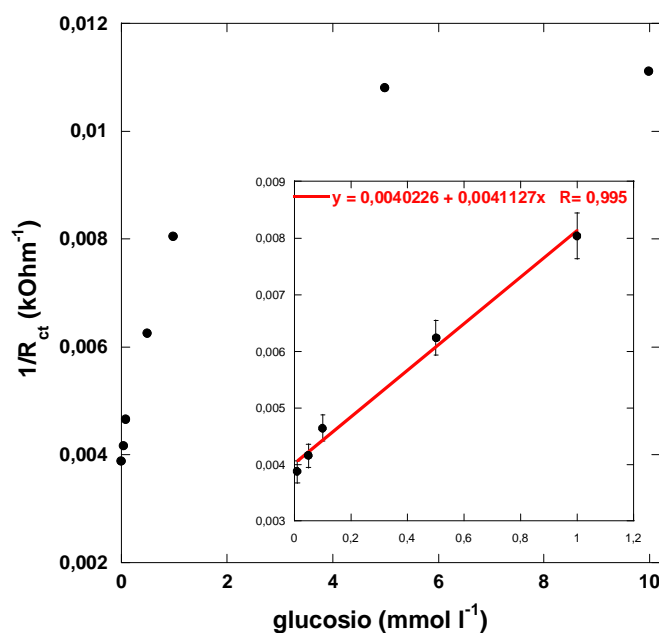


Figura 50 Grafico della risposta del biosensore Pt-OPPy-GOD in funzione di concentrazioni crescenti di glucosio. L'inserto mostra il range di concentrazione nel quale tale dispositivo mostra un andamento lineare.

Nell'inserto all'interno del grafico viene evidenziato l'intervallo di linearità di tale biosensore che cade nel range di concentrazione che va da 0.1mM a 1mM.

Il biosensore è stato testato anche in presenza degli interferenti per valutare l'andamento della  $R_{ct}$  quando questi sono presenti in soluzione.

Il grafico di Nyquist relativo a tale prova è il seguente:

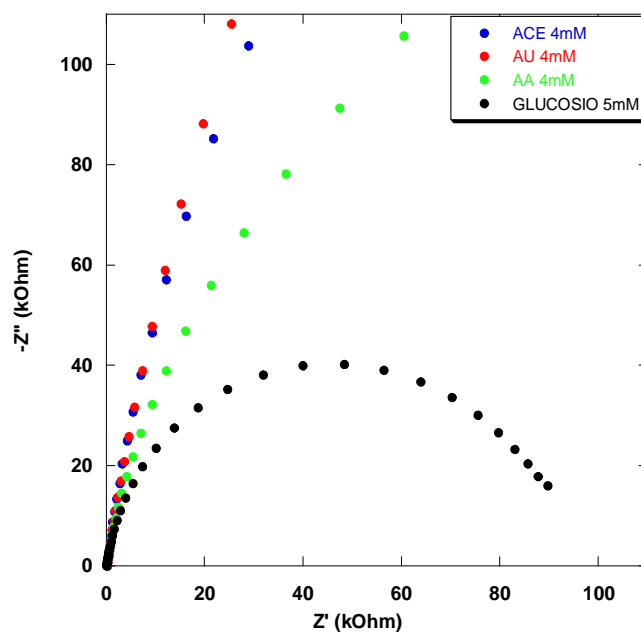


Figura 51 Spettro di impedenza per il biosensore Pt-OPPy-GOD in soluzioni di glucosio, 5mM acetamminofene 4mM, acido ascorbico 4mM e acido urico 4mM; potenziale OCV vs Ag|AgCl. Range di frequenze compreso tra 10kHz-0.01Hz.

Il biosensore risponde bene al glucosio e non risente della presenza degli interferenti, come si può vedere dalle  $R_{ct}$  nel grafico riportato in figura 51.

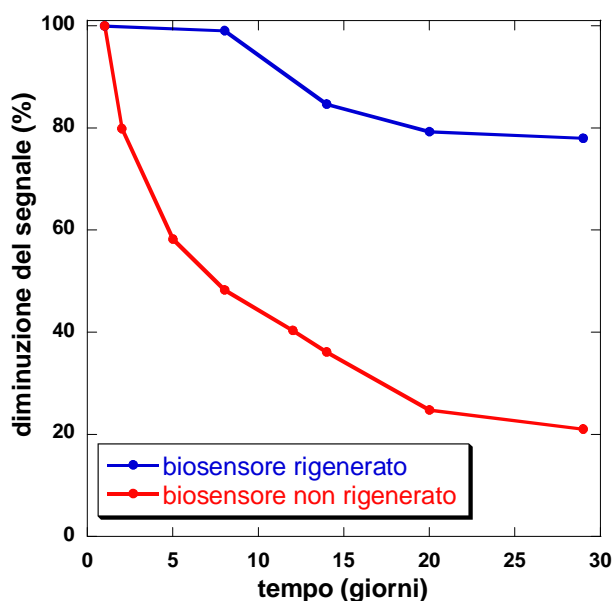
Anche in questo caso si è ottenuto un risultato analogo a quello riportato in figura 44 per l'OPPy con  $H_2O_2$  e gli interferenti e ciò dimostra come la tecnica di immobilizzazione adottata non modifica in maniera sostanziale la struttura del polimero, garantendo una risposta del dispositivo chiara e sensibile.

Le caratteristiche del metodo e il campo applicativo del dispositivo vengono riassunti nella seguente tabella.

**Tabella 6** Tabella riassuntiva delle caratteristiche del metodo impedimetrico per la determinazione del glucosio con Pt/OPPy/GOD.

Metodo	Range di linearità	LOD	LOQ	Sensibilità	Durata	RSD (%)	Equazione
EIS	10 $\mu$ mol/l-1mmol/l	1 $\mu$ mol/l	10 $\mu$ mol/l	0.0041 l/K $\Omega$ mmol	100''	7.1	$y=0.0041x+0.004$
Utilità	Campo alimentare per la determinazione degli zuccheri nelle bevande come succhi di frutta, mosto d'uva e vino. Il saccarosio è anche determinabile previa trasformazione in glucosio e fruttosio per azione dell'invertasi.						

Come ultima fase del lavoro, determinante per l'applicazione pratica del biosensore, è stata studiata nel tempo la risposta impedimetrica del dispositivo come fin'ora assemblato, seguendo il suo comportamento sempre nelle medesime condizioni sperimentali e cioè in presenza di una soluzione di glucosio 5mM. Il grafico relativo è il seguente:



**Figura 52** Grafico della stabilità nel tempo del biosensore Pt-OPPy-GOD.

La stabilità del biosensore Pt-OPPy-GOD è stata calcolata come diminuzione percentuale ( $D(\%)$ ) del valore iniziale di  $1/R_{ct}$ , nel seguente modo:

$$D(\%) = \frac{\frac{1}{R_{ct(x)}} - \frac{1}{R_{ct(0)}}}{\frac{1}{R_{ct(0)}}} \cdot 100$$

Come mostrato in figura 52, il biosensore, entro 30 giorni dal suo assemblaggio, mostra una caduta di attività fino ad un valore pari al 20% di quella iniziale. A tal proposito, per implementare la performance del dispositivo, si è pensato ad una strategia di “rigenerazione” finalizzata al mantenimento dell’attività iniziale per un periodo di tempo che possa essere il più lungo possibile. Questo obiettivo è stato raggiunto mediante la ripetizione dell’elettrodeposizione della glucosio ossidasi ogni qual volta che il dispositivo biosensoristico veniva testato, permettendo il ripristino della quantità di enzima sul polimero. La “rigenerazione” si è dimostrata un metodo estremamente valido per mantenere elevata l’attività del biosensore (dopo 30 giorni era ancora all’80% di quella iniziale) e ciò è tutto a vantaggio di un risparmio di tempo, di un risparmio di prodotti con conseguente abbattimento dei costi e, soprattutto, con una riduzione dell’impatto ambientale. Sono, comunque, necessari periodi prolungati di verifica per avere una visione più completa dell’attività del biosensore e questi sono attualmente in corso di studio nel nostro laboratorio.

Un ulteriore e interessante aspetto dello studio di queste matrici polimeriche sta nel fatto che è possibile recuperare il liquido ionico, utilizzato come mezzo elettrolitico di sintesi, mediante estrazioni con acqua distillata a caldo. Questa metodologia è possibile poiché il liquido ionico  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$ , in quanto fortemente idrofobo, è solubile nei solventi organici e insolubile in quelli acquosi. Viceversa tutti i prodotti secondari della sintesi del polipirrolo sono solubili nei solventi acquosi per cui è sufficiente effettuare cinque trattamenti estrattivi con  $\text{H}_2\text{O}$  distillata a caldo per poter ripristinare le proprietà chimico-fisiche iniziali del liquido ionico stesso (come ad esempio la conducibilità elettrica). A dimostrazione di ciò è stata effettuata una voltammetria ciclica su due diversi campioni di liquido ionico: uno tal quale e senza traccia di impurezze, e un altro utilizzato innumerevoli volte per la sintesi del polipirrolo e purificato come detto in precedenza. Di seguito se ne riporta il voltammogramma:

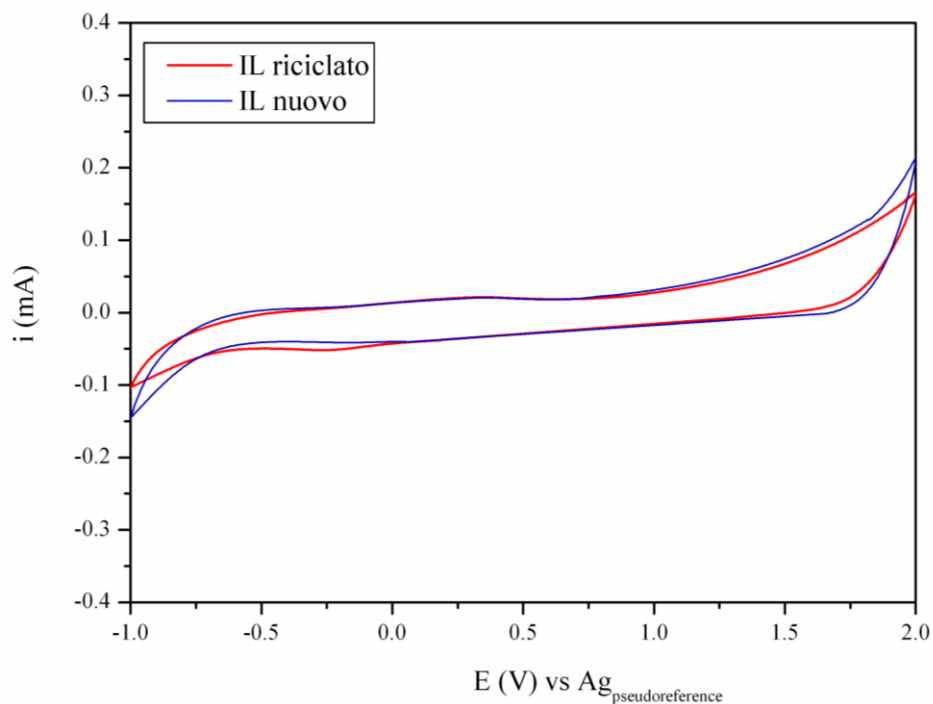


Figura 53 VC del liquido ionico come tale (in blu) e dopo aver subito trattamenti di estrazione a caldo con H<sub>2</sub>O distillata (in rosso). Range di potenziale compreso tra -1V < E vs Ag<sub>pseudoreference</sub> < +2V; velocità di scansione 50mV/s per 2 cicli.

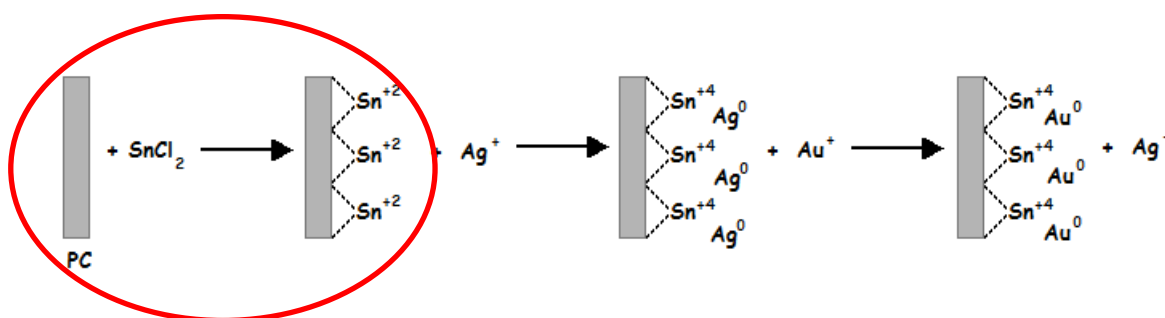
Si può notare come le due curve sono pressoché sovrapponibili e l'assenza di picchi, sia anodici che catodici, dimostra che non sono presenti specie elettroattive in grado di dare una reazione di ossidoriduzione.

### 8.3 Nanotubi d'oro: condizioni sperimentali

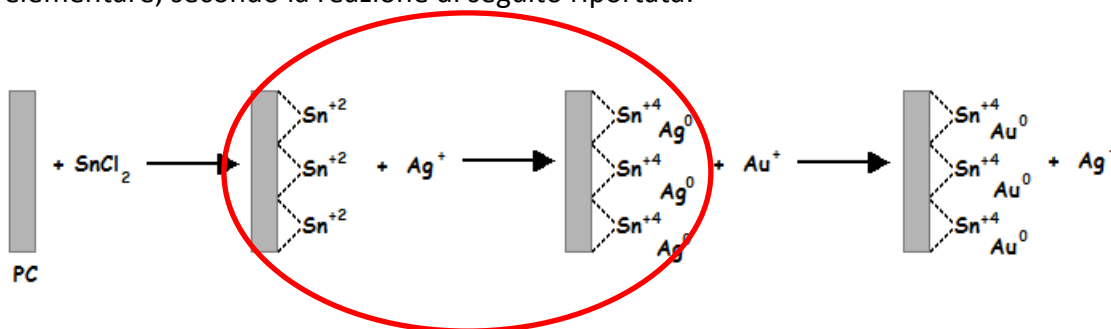
La sintesi dei nanotubi d'oro si basa, come abbiamo già accennato, sul trattamento della membrana porosa di policarbonato in diverse soluzioni appositamente preparate con un procedimento "electroless" (cioè una serie di processi ossido-riduttivi senza l'applicazione di potenziali elettrici).

La prima soluzione è composta da solo metanolo  $\text{CH}_3\text{OH}$  in cui la membrana rimane immersa per due ore per consentirne il lavaggio da ogni tipo di residuo organico e inorganico.

La seconda soluzione contiene  $\text{SnCl}_2$  0.026M e  $\text{CF}_3\text{COOH}$  0.07M in una miscela di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata e  $\text{CH}_3\text{OH}$  in proporzioni 1:1 in cui vi si immerge la membrana di policarbonato per circa cinque minuti; dopodiché si sciacqua mediante immersione per quarantacinque minuti in  $\text{CH}_3\text{OH}$  assoluto. Questi due passaggi consentono di sensibilizzare il template di policarbonato mediante adsorbimento degli ioni  $\text{Sn(II)}$ .



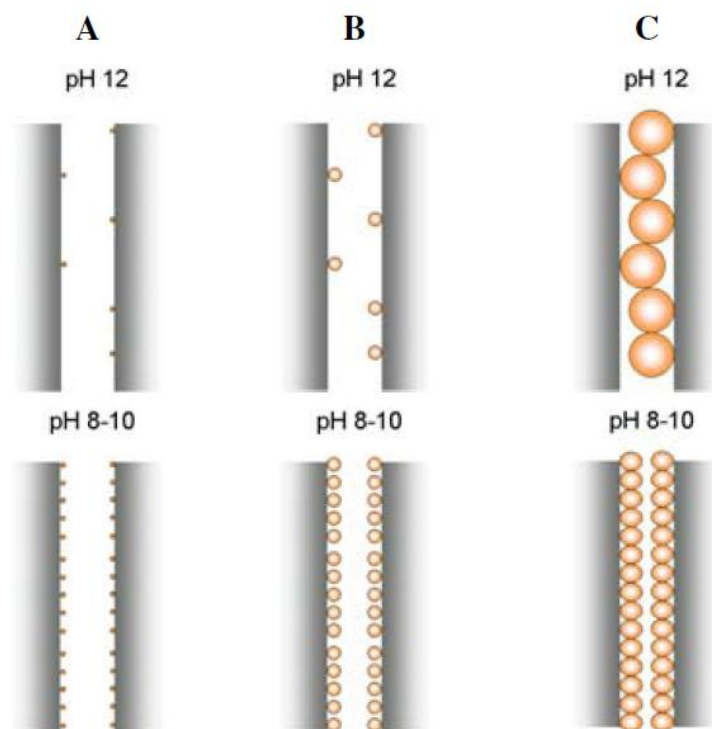
La membrana viene poi immersa in una terza soluzione composta da  $\text{AgNO}_3$  0.029M ammoniacale per  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28-30% in peso. Questo passaggio causa un'ossidazione sulla superficie.  $\text{Sn(II)}$  è ossidato a  $\text{Sn(IV)}$  e  $\text{Ag(I)}$  è ridotto a  $\text{Ag(0)}$  elementare; secondo la reazione di seguito riportata:



Anche dopo questa immersione, che dura circa dieci minuti, bisogna sciacquare la membrana con  $\text{H}_2\text{O}$  distillata.



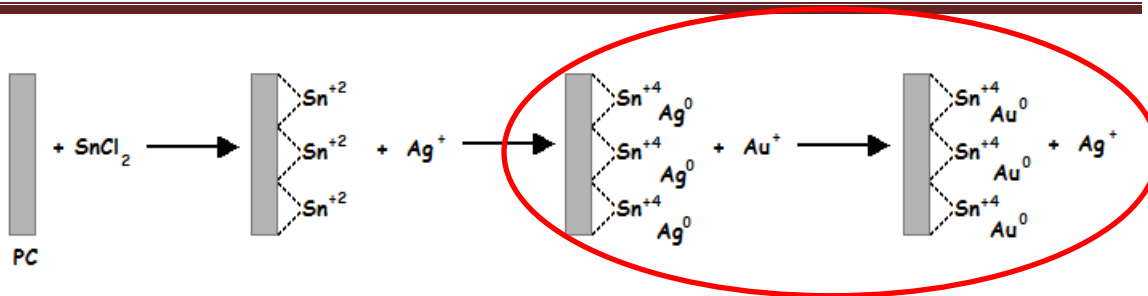
Si immerge, quindi, la membrana nel cosiddetto “bagno d’oro” composto da  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  0.127M e  $\text{Na}_3\text{Au}(\text{SO}_3)_2$   $7.9 \times 10^{-3}\text{M}$  (Oromerse part B.) precedentemente diluito 1:40 con una soluzione di idrogeno carbonato di sodio  $\text{NaHCO}_3$  0.025M tamponata a pH 10. Il controllo del pH è importante in quanto è stato dimostrato [190] che è in grado di influenzare la cinetica di accrescimento dei grani di oro nei nanotubi. A pH 10, come riportato in figura 54, la crescita dei nanotubi è più lenta e regolare e quindi il materiale ottenuto è elettrochimicamente migliore.



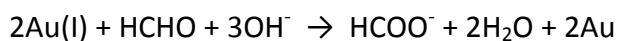
**Figura 54** Influenza del pH nella deposizione “electroless” dell’oro nei nanotubi. Paragone tra diverse condizioni: in alto il pH è 12 e in basso è compreso tra 8-10; e per diversi tempi di immersione: A, pochi minuti, B compreso tra 1-2h e C fino a 17h.

Attraverso questo procedimento si ottiene la crescita del metallo, all’interno dei siti attivati nella parete dei pori, e la deposizione procede dalla parete degli stessi verso il centro.

La membrana è lasciata in questa soluzione per trenta minuti. In tal modo si permette la deposizione dell’Au nei nanotubi e la loro crescita. Le particelle di  $\text{Ag}(0)$  vengono così galvanicamente spostate dall’oro in quanto quest’ultimo è un metallo più nobile.



Successivamente, si aggiunge alla soluzione del bagno d'oro, formaldeide HCHO in modo da ottenere una concentrazione pari a 0.625M e si lascia la membrana in immersione per circa quindici ore alla temperatura di 0-2°C; trascorse le quali si aggiunge ancora formaldeide 0.3M, lasciando sempre in immersione per altre nove ore alla temperatura di 0-2°C. Le particelle di Ag fungono da siti di catalisi per l'ossidazione della formaldeide e lo stesso oro già ridotto in forma metallica (grani nanometrici) funge da auto catalizzatore e centro di accrescimento per i nanotubi secondo la seguente reazione:



Si sciacqua la membrana con acqua e infine si immerge in una soluzione di acido nitrico  $\text{HNO}_3$  al 25% in peso per circa dodici ore. In questo modo si riportano in soluzione tutti i residui di Sn e Ag presenti.

La membrana di policarbonato a questo punto è completamente ricoperta (e ovviamente riempita) di uno strato di oro e quindi può essere sciacquata con acqua un'ultima volta ed asciugata in corrente di azoto.

I nanotubi così ottenuti sono immersi nel policarbonato e quindi espongono solo piccole aree di oro le quali sono insufficienti per produrre un segnale elettrochimico utilizzabile per scopi analitici. Per questo motivo si è resa necessaria la parziale eliminazione della membrana di policarbonato (come mostrato in figura 55) in modo da aumentare la superficie esposta dei nanotubi e quindi la superficie elettroattiva. Questo è stato possibile mediante rimozione dello strato di oro depositato sulla faccia esposta della membrana, in modo da lasciare esposto il template sottostante. Quest'ultimo, essendo solubile in solventi organici, è stato parzialmente rimosso mediante discioglimento in una soluzione 1:9 di diclorometano ed etanolo per diversi tempi di immersione (10 e 30 secondi). Trascorso questo tempo, si ferma lo scioglimento del policarbonato immergendo la membrana in etanolo puro e infine si risciacqua abbondantemente con acqua distillata.

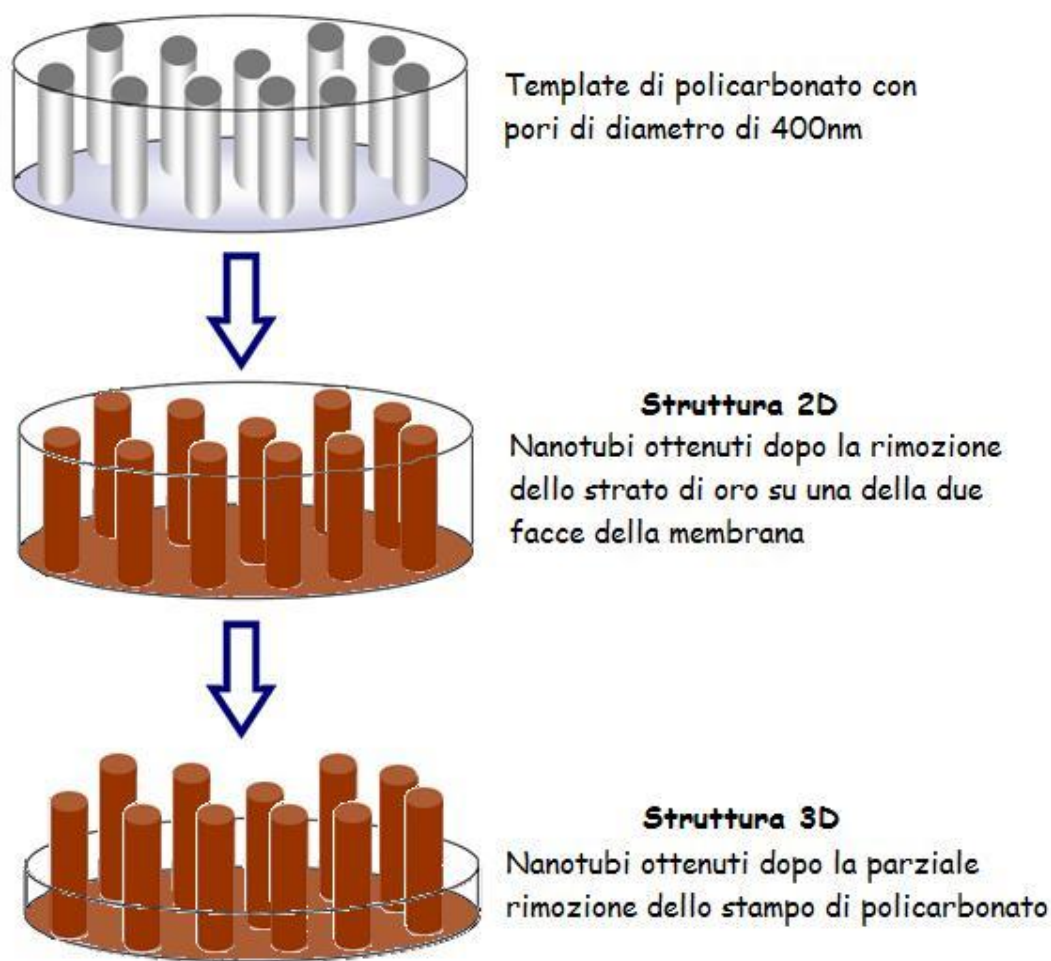


Figura 55 Rimozione parziale del policarbonato con formazione di nanoelettrodi tridimensionali.

Si utilizza la miscela di solventi in quanto il diclorometano è il responsabile della rimozione del PC, mentre l'etanolo è usato per diminuire il suo potere dissolutore e quindi serve a controllare meglio la lunghezza dei nanotubi esposti dalla membrana. Infine per fare in modo che i nanotubi di metallo siano ben saldati sulla membrana polimerica, questa viene trattata in stufa ad una temperatura appena al di sopra di quella di transizione vetrosa (150°C per il policarbonato). Inoltre questo passaggio rende la membrana di policarbonato meccanicamente più resistente e questo rappresenta un vantaggio in quanto a seguito della manipolazione per fermare la membrana stessa sull'elettrodo, potrebbero verificarsi delle infiltrazioni tali da falsare i risultati sperimentali.



**Figura 56** Membrana bloccata su un elettrodo di platino per mezzo di un o-ring di teflon che assicura la tenuta stagna del contatto elettrico tra Pt e Au dei nanotubi.

Per verificare la bontà del materiale così progettato, è stata eseguita una caratterizzazione elettrochimica per mezzo della voltammetria ciclica, eseguendo le scansioni di potenziale a diversa velocità (da 2mV/s fino a 1000mV/s) in soluzioni di potassio ferricianuro e cloruro di esamminorutenio (entrambi alle concentrazioni di 0.5, 1 e 10mM). Questa verifica è necessaria per valutare se a basse velocità di scansione, questo materiale si comporta realmente come un insieme di nanoelettrodi.

Inoltre, poiché preliminarmente questo lavoro è finalizzato alla realizzazione di sensori e biosensori, si è studiato il comportamento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  in tampone fosfato a pH 7.

La spettroscopia di impedenza è stata condotta in soluzioni 0.01M di  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  e  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  e in soluzioni con concentrazioni crescenti di  $\text{H}_2\text{O}_2$ , in tampone fosfato a pH 7 in condizioni di OCV in un range di frequenze compreso tra 10kHz e 0.1Hz.

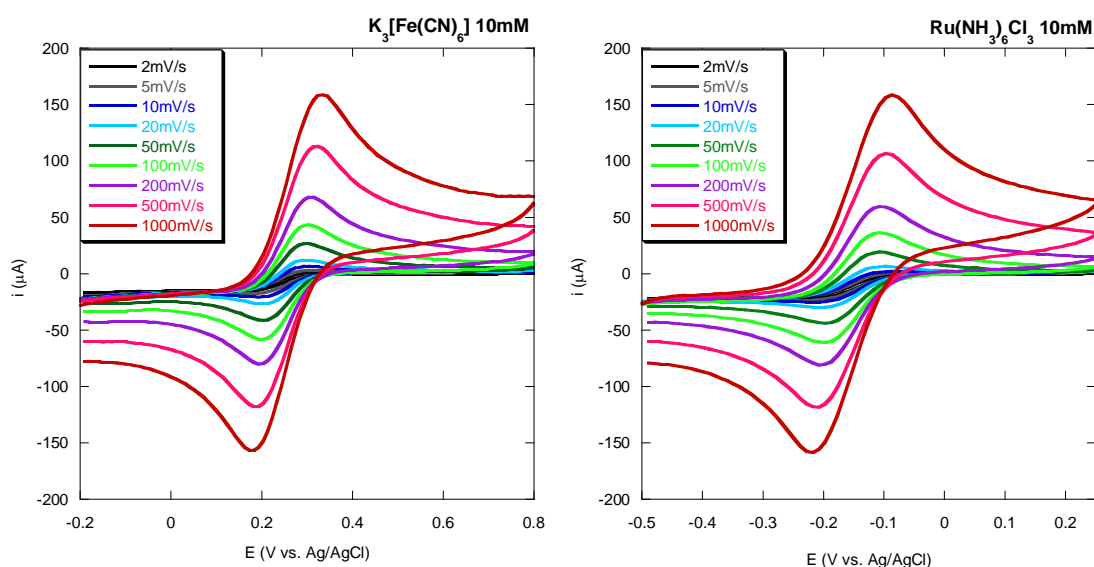
Le membrane sono state testate anche mediante cronoamperometria impostando il potenziale a  $E=0.8\text{V}$  vs Ag/AgCl per 4000 secondi e registrando la risposta in corrente quando vengono effettuate aggiunte di  $\text{H}_2\text{O}_2$  a concentrazione crescente.

I nanotubi così studiati, sono risultati idonei allo sviluppo di un dispositivo biosensoristico ma avendo una superficie non idonea all'immobilizzazione dell'enzima, si è resa necessaria un'ulteriore manipolazione di tale materiale mediante ricopertura con il polipirrolo overossidato la cui sintesi è avvenuta mediante procedura elettrochimica (già nota ed illustrata in questo lavoro di tesi). L'uso di questo secondo materiale si è reso necessario per rispondere anche ad una seconda esigenza e cioè quella di ottenere una membrana semipermeabile che consenta il passaggio dell'analita di interesse analitico in maniera selettiva.

Il biosensore ottenuto a seguito dell'immobilizzazione della glucosio ossidasi mediante elettroassorbimento sul polipirrolo (vedi procedura già illustrata in questo lavoro di tesi a pagina 90), è stato testato sia mediante spettroscopia di impedenza che cronoamperometria.

## 8.4 Nanotubi d'oro: risultati e discussione

Dopo avere effettuato la sintesi dei nanotubi, questi sono stati controllati mediante voltammetria ciclica utilizzando soluzioni di potassio ferricianuro e di cloruro di esamminorutenio. Le scansioni sono state effettuate variando la velocità e la concentrazione di analita. Di seguito si riportano i grafici relativi alle voltammetrie (si riportano solo le curve registrate alla concentrazione di 10mM) per entrambi gli analiti.



**Figura 57** Voltammetrie cicliche effettuate in soluzioni acquose di KCl 0.2M con due diversi probes elettrochimici: a sinistra con potassio ferricianuro e a destra con cloruro di esamminorutenio. Velocità di scansione: 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 e 1000mV/s e potenziale compreso tra  $-0.2V < E \text{ vs Ag/AgCl} < 0.8V$  nel caso  $\text{Fe(II)/Fe(III)}$  e  $-0.5V < E \text{ vs Ag/AgCl} < 0.25V$  nel caso del  $\text{Ru(III)/Ru(IV)}$ .

Come atteso aumentando la velocità di scansione, aumenta l'intensità di corrente del picco ( $i_{p_c}$ ) sia in ossidazione che in riduzione secondo quanto previsto dall'equazione di Randles-Sevcik [191]:

$$i_{p_c} = 0.4463 \cdot n \cdot F \cdot A \cdot C \cdot \sqrt{\left( \frac{n \cdot F \cdot v \cdot D}{R \cdot T} \right)}$$

dove  $n$  = numero di elettroni trasferiti

$F$  = costante di Faraday

$A$  = area superficiale dell'elettrodo in  $\text{cm}^2$

$v$  = velocità di scansione in  $\text{V/s}$

$D$  = coefficiente di diffusione

$C$  = carica in Coulomb

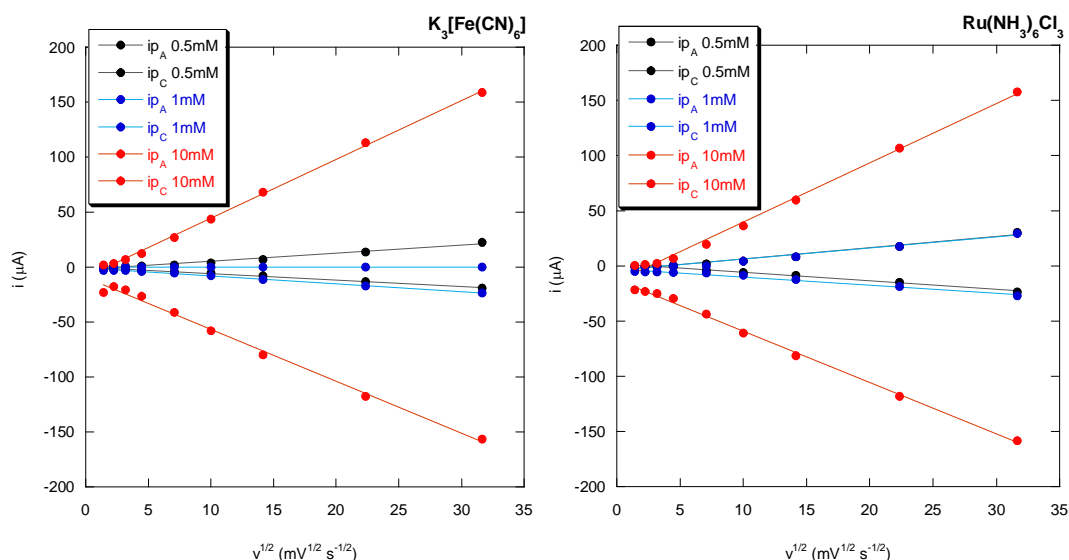
$R$  = costante dei gas

$T$  = temperatura

Questa equazione ammette la linearità della corrente di picco all'aumentare della radice quadrata della velocità di scansione solo nel caso in cui il coefficiente di diffusione sia costante:

$$i_{p_c} \propto \sqrt{D \cdot v}$$

Per quanto riguarda i macroelettrodi questo è sempre verificato, ma nel caso dei nanotubi questa condizione si realizza solo da una certa velocità di scansione, come si può notare nei grafici di seguito riportati:

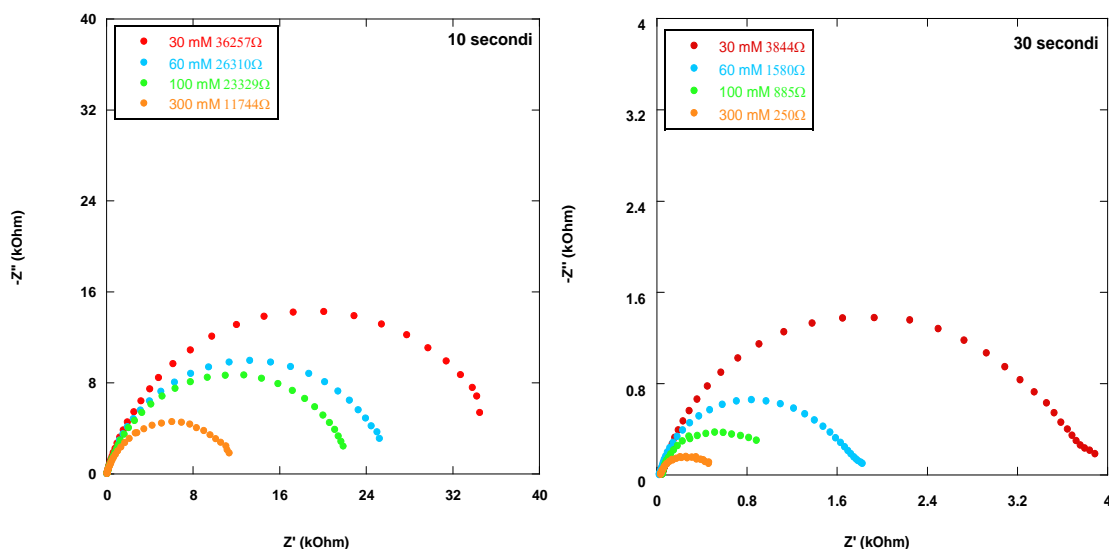


**Figura 58** Grafici che riportano i valori della corrente di picco (anodico e catodica) in funzione della radice quadrata della velocità di scansione. A sinistra con soluzioni a diversa concentrazione di potassio ferricianuro e a destra con soluzioni a diverse concentrazioni di cloruro di esamminorutenio.

Il corretto allineamento dei punti si verifica solo per velocità di scansione superiori a 20mV/s. Questo è dovuto al fatto che, per velocità inferiori si ha un fronte di diffusione radiale ad ogni singolo nanotubo e quindi il coefficiente di diffusione aumenta all'aumentare della stessa velocità di scansione. Superati i 20mV/s, si ha la totale sovrapposizione dei fronti radiali di diffusione tale da creare un fronte di diffusione lineare tipico dei macroelettrodi così che il coefficiente di diffusione  $D$  rimane costante al variare della velocità di scansione (vedi pagina 50).

Le membrane sono state studiate anche mediante la spettroscopia di impedenza per valutare la reazione del trasferimento di carica di  $H_2O_2$  su due diversi campioni di

nanotubi che differiscono per il diverso grado di rimozione del template di policarbonato (uno sciolto per 10 secondi e l'altro per 30). Di seguito si riportano gli spettri relativi a concentrazioni crescenti di  $\text{H}_2\text{O}_2$ :



**Figura 59** EIS del sensore Pt-AuNTs con diverso tempo di dissoluzione del PC rispetto ad  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nella legenda sono riportati i valori di  $R_{ct}$  associati ai singoli spettri. Potenziale all'OCV vs Ag/AgCl, range di frequenza compreso tra 10kHz e 0.1Hz.

Come si può notare l'effetto dei diversi tempi di dissoluzione della membrana di PC è evidente negli spettri di impedenza dove si ha una notevole variazione di  $R_{ct}$  nei casi riportati. Infatti quando il PC è sciolto per 10 secondi, si ottengono valori di  $R_{ct}$  molto maggiori rispetto a quelli ottenuti per dissoluzione di 30 secondi a parità di concentrazione, con una differenza di almeno un ordine di grandezza. Ciò dimostra come nel secondo caso il processo di charge transfer sia favorito poiché il nanomateriale con una maggiore superficie attiva esposta presenta caratteristiche elettrochimiche migliori e quindi il lavoro di questa tesi si incentrerà solo su questa procedura di sintesi per questo materiale. Il valore di  $R_{ct}$  risultante dalle analisi impedimetriche è stato calcolato utilizzando il software Z-view con un errore inferiore al 4 %.

Per quanto riguarda la risposta amperometrica ad  $\text{H}_2\text{O}_2$ , questa è stata effettuata mediante aggiunte successive ogni 100 secondi di 30,6  $\mu\text{l}$  di una soluzione 9.8M di tale analita in 10ml di tampone fosfato a pH 7 impostando il potenziale a  $E=0.8\text{V}$  vs Ag/AgCl.



L'indagine è stata finalizzata ad indagare l'entità della risposta in corrente, quando nella cella elettrochimica vengono effettuate delle aggiunte di  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Il grafico  $I$  vs.  $t$  illustra il comportamento del sistema in presenza di  $\text{H}_2\text{O}_2$ :

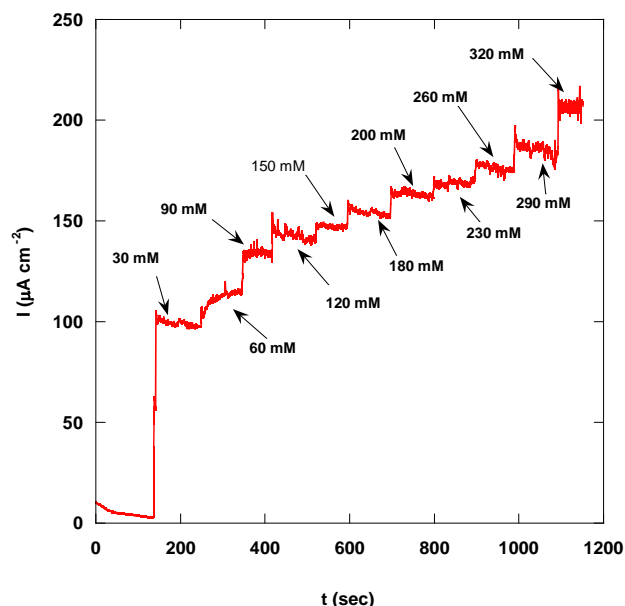


Figura 60 Cronoamperometria del sensore Pt-AuNTs per  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; potenziale  $E=0.8\text{V}$  vs Ag/AgCl; range di concentrazione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  è compreso tra 30mM-320mM.

Graficando il valore della densità di corrente, in funzione della concentrazione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  aggiunta, si ottiene il seguente grafico:

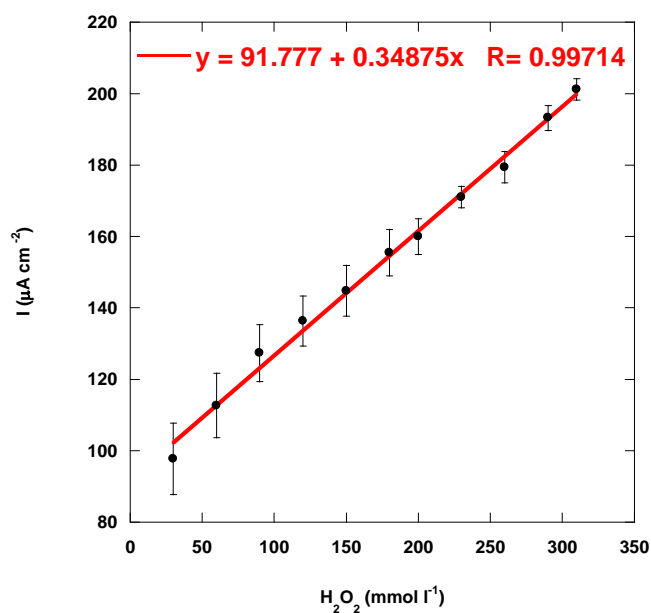


Figura 61 Risposta del sensore Pt/AuNTs in funzione di concentrazioni crescenti di  $\text{H}_2\text{O}_2$ . I punti si dispongono sulla retta di cui si riporta l'equazione ottenuta per interpolazione e la relativa regressione.

La deviazione standard, riportata nel grafico in figura 61, è stata calcolata per 5 campioni di AuNTs sintetizzati e testati nelle medesime condizioni sperimentali. Le incoraggianti risposte fornite da questo dispositivo hanno dato seguito alla realizzazione di un biosensore per il glucosio mediante un enzima ossidasi, nel nostro caso la glucosio ossidasi. Si sono evidenziati dei problemi relativi ad una inefficace immobilizzazione della GOD sugli elettrodi in studio a causa della limitata superficie dei nanotubi d'oro e per superare tale limite si è resa necessaria una modifica di tale materiale elettrodico.

Si è pensato di ricoprire i nanotubi con polipirrolo overossidato (OPPy) mediante elettrodeposizione per poter sfruttare la miglior superficie di aggancio data dal polimero mantenendo le buonissime prestazioni rispetto alla scarica di  $\text{H}_2\text{O}_2$  fornite dai nanotubi.

Per verificare il comportamento del materiale realizzato in questo modo sono state eseguite analisi di determinazione analitica.

Una volta elettrosintetizzato e overossidato il polimero, prima dell'immobilizzazione dell'enzima, si è proceduto alle prove con  $\text{H}_2\text{O}_2$  per valutare se il sistema è adatto ad un uso biosensoristico. Le analisi impedimetriche mostrano come questo sistema costituito da due materiali risponda linearmente a concentrazioni crescenti di tale analita.

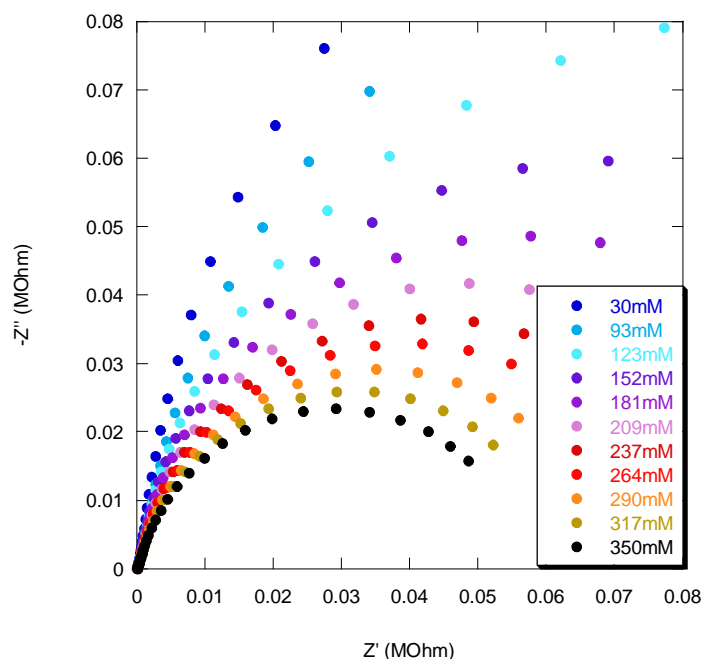


Figura 62 Spettri di impedenza registrati per il sistema Pt-AuNTs-OPPy per soluzioni di  $\text{H}_2\text{O}_2$  a concentrazione crescente. Potenziale all'OCV vs Ag/AgCl, range di frequenza compreso tra 10kHz e 0.1Hz.

La curva che descrive la variazione del reciproco dell' $R_{ct}$  relativa alla charge transfer di  $\text{H}_2\text{O}_2$  in funzione dell'aumento della sua concentrazione è la seguente:

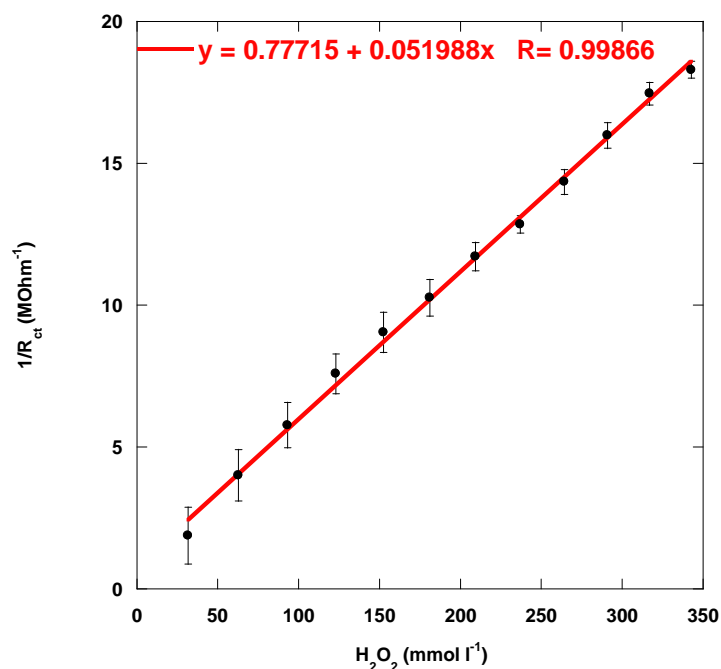


Figura 63 Grafico della risposta impedimetrica del sensore Pt-AuNTs-OPPy. Si riporta l'andamento del reciproco dell' $R_{ct}$  in funzione di concentrazioni crescenti di  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

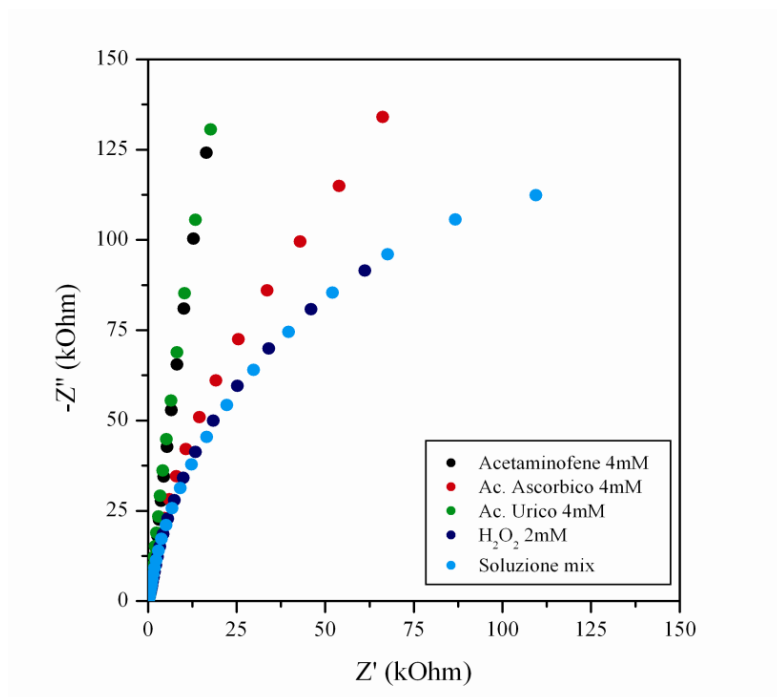
La deviazione standard, riportata nel grafico in figura 63, è stata calcolata per 5 campioni di AuNTs-OPPy sintetizzati e testati nelle medesime condizioni sperimentali. Nonostante la presenza del polimero faccia aumentare la  $R_{ct}$  di  $H_2O_2$  all'interfase rispetto a quanto osservato per i nanotubi non modificati, si può comunque notare un andamento lineare nell'intervallo di concentrazione che va da 30 a 350mM. Il dispositivo è stato testato nelle medesime condizioni sperimentali anche attraverso analisi amperometriche classiche e più volte riportate in letteratura. I risultati ottenuti con questa metodologia non sono di interesse analitico e pertanto non vengono riportati in quanto il metodo impedimetrico è più innovativo e permette di lavorare a potenziali meno distruttivi per materiali e molecole bioattive e consente la scarica riduttiva di  $H_2O_2$  evitando in questo modo la contemporanea ossidazione di specie chimiche secondarie.

Di seguito si riporta la tabella riassuntiva dei due metodi utilizzati per la determinazione di  $H_2O_2$ .

**Tabella 7** Tabella riassuntiva delle caratteristiche dei metodi elettrochimici per la determinazione di  $H_2O_2$  con Pt/AuNTs (cronoamperometria) e per il sistema Pt/AuNTs/OPPy (impedimetria).

Metodo	Range di linearità	LOD mmol/l	LOQ mmol/l	RSD (%)	Sensibilità	Durata	Equazione
EIS	30-350mmol/l	1	30	7.5	0.05l/MΩ mmol	100''	$y=0.05x+0.78$
AMPERO	30-320mmol/l	10	30	9.6	0.35μA l/mol cm <sup>2</sup>	120''	$y=0.35x+91.78$
Utilità	Campo clinico per la determinazione del grado di stress ossidativo cellulare responsabile dell'invecchiamento e deterioramento strutturale.						

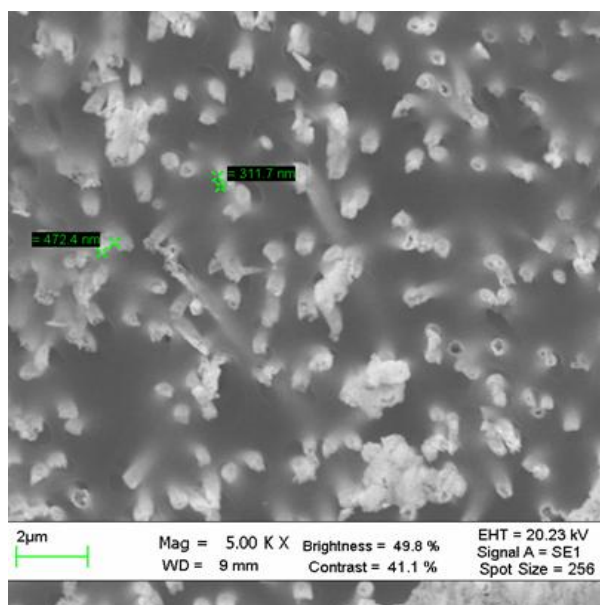
Inoltre al fine di valutare la permselectività del sistema Pt-AuNTs-OPPy è stata studiata la risposta impedimetrica a diversi analiti che possono essere presenti nelle matrici dei campioni reali come ad esempio, acetamminofene, acido ascorbico ed acido urico. Queste sostanze sono state testate a concentrazioni 10 volte superiori rispetto a quelle riscontrabili nei fluidi biologici. Di seguito si riporta il grafico di Nyquist nel quale si può notare che l'unica reazione di trasferimento di carica osservabile è relativa all' $H_2O_2$  anche quando essa è presente contemporaneamente agli interferenti.



**Figura 64** Spettri di impedenza relativi alla reazione di trasferimento di carica di diverse soluzioni: acetaminofene, acido ascorbico, acido urico, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e una soluzione contenente tutti e quattro i precedenti composti. Potenziale all'OCV vs Ag/AgCl, range di frequenza compreso tra 10kHz e 0.1Hz.

Lo studio della morfologia dei AuNTs e degli stessi modificati con OPPy è stata effettuata mediante analisi SEM.

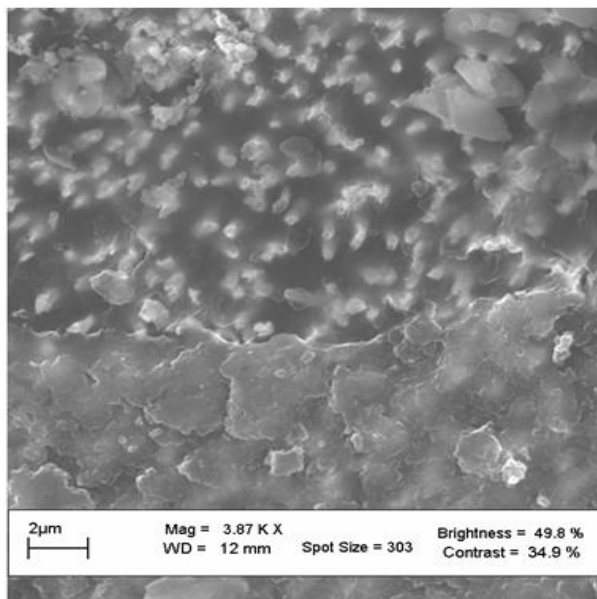
La prima immagine mostra la struttura dei AuNTs tridimensionali e si può notare, infatti, come questi sporgano dalla membrana di PC e presentino una disomogenea distribuzione tipica del tamplate nel quali sono stati cresciuti.



**Figura 65** SEM dei AuNTs con lo strato di oro rimosso e PC parzialmente dissolto.

La maggior parte delle nanostrutture appaiono cave e questo è da imputare alla durata della deposizione dell'oro durante la sintesi (meno di 24h) [192,193]. E' stato possibile stimare l'altezza dei nanotubi dal template di policarbonato e questa è compresa tra 300 e 400nm e il diametro, che risulta corrispondente a circa quello dei pori della membrana (400nm).

La seconda immagine mostra la membrana d'oro ricoperta con OPPy elettrosintetizzato.



**Figura 66 SEM dei AuNTs con OPPy elettrosintetizzato. Il polimero ricopre omogeneamente tutta la superficie della membrana.**

In questa figura si può osservare come al di sotto dello strato di polimero, volutamente rimosso, siano presenti i nanotubi. Dall'immagine risulta evidente che il polimero è omogeneamente distribuito su tutta la superficie, anche quella isolante del policarbonato. Questo ad indicare che durante l'elettrosintesi del polipirrolo si è instaurato un fronte di potenziale, e quindi di diffusione, lineare e non radiale tale da permettere la polimerizzazione del pirrolo con lo stesso profilo in corrente osservato per un normale macroelettrodo (vedi figura 33 e 34).

Al termine della caratterizzazione dei nanotubi d'oro modificati con OPPy, il biosensore è stato assemblato immobilizzando la glucosio ossidasi attraverso due differenti strategie.

In un primo caso, la *glucosio ossidasi* è stata immobilizzata mediante l'attivazione dei suoi gruppi carbossilici [194] per azione di N-idrossisuccinimide (NHS) ed N-(dimetil

amminopropil)-N-etilcarbodiimide (EDC) così che, a seguito di ciò, i gruppi amminici del OPPy possano formare il legame peptidico con il suddetto enzima.

Il meccanismo della reazione di immobilizzazione è il seguente:

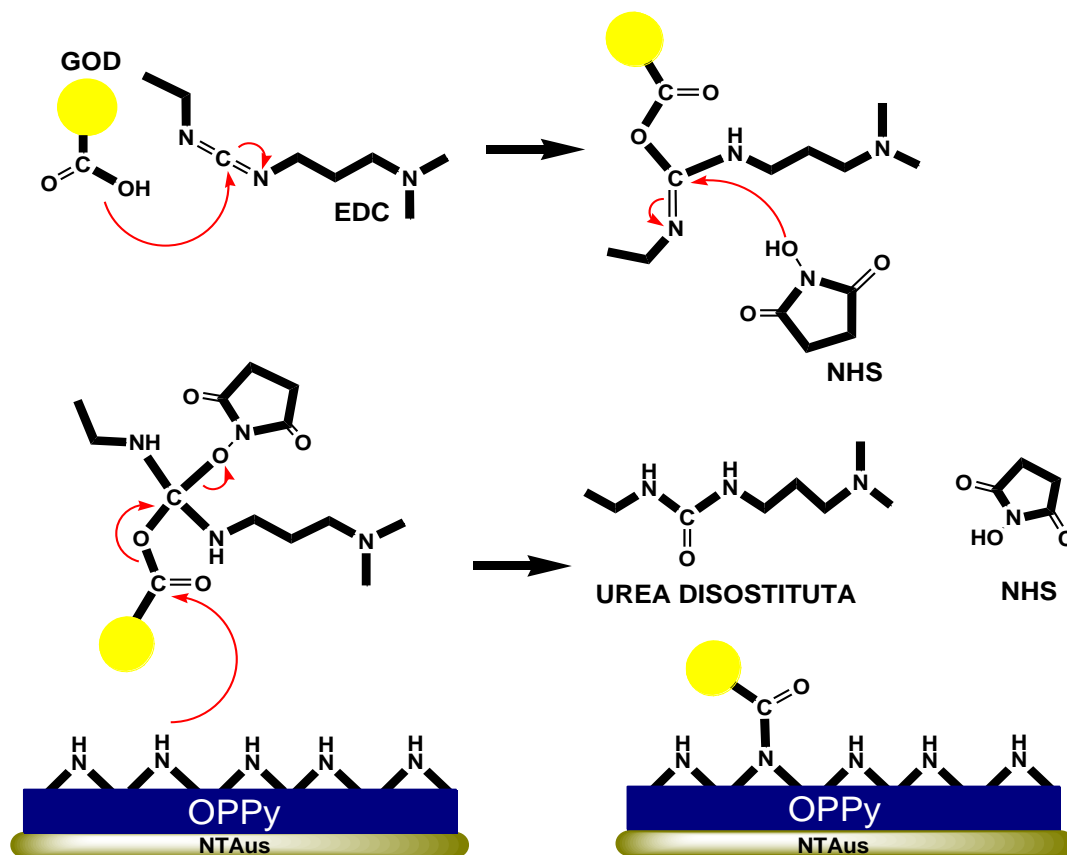


Figura 67 Reazione di immobilizzazione della GOD su Pt-AuNTs-OPPy con EDC ed NHS.

Nel secondo caso l'enzima è stato elettrodepositato sul polimero come procedura precedentemente illustrata (vedi pagina 90).

Il polipirrolo overossidato gioca un ruolo cruciale come substrato per l'adsorbimento elettrochimico della *glucosio ossidasi*, contribuendo alla funzionalità e alla stabilità del biosensore finale.

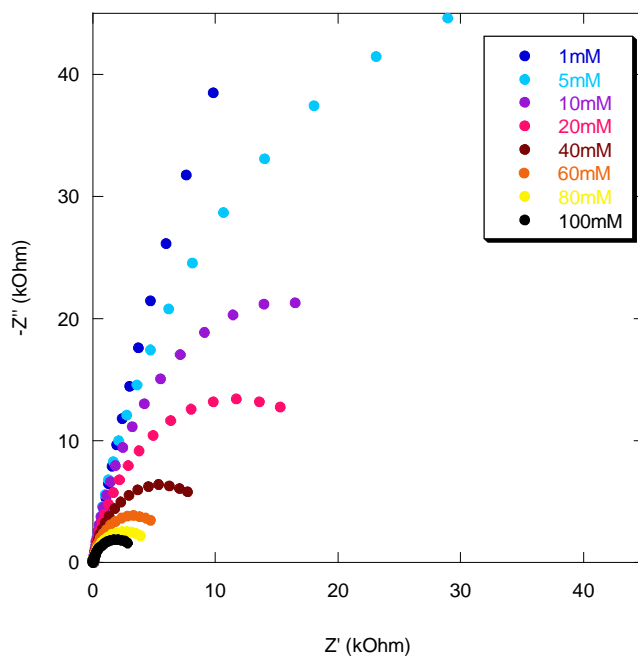
Come descritto in precedenza questa procedura è particolarmente rapida e pulita in quanto non vengono utilizzati altri reattivi, se non l'enzima stesso, in modo da evitare l'introduzione di possibili interferenze sulla superficie elettrodica che possano disturbare l'attività della *glucosio ossidasi*.

Il biosensore con l'enzima elettroadсорbito è stato testato sia per via impedimetrica e sia per via amperometrica.

Le condizioni sperimentali alle quali è stato testato (OCV, in T.F. 0.1M, in un range di frequenze compreso tra 10kHz e 0.1Hz) hanno permesso di indagare l'entità della

resistenza al trasferimento di carica, quando nella cella elettrochimica vengono effettuate delle aggiunte di una soluzione di glucosio a concentrazione crescente.

L'andamento di questa risposta è illustrato nel seguente grafico:

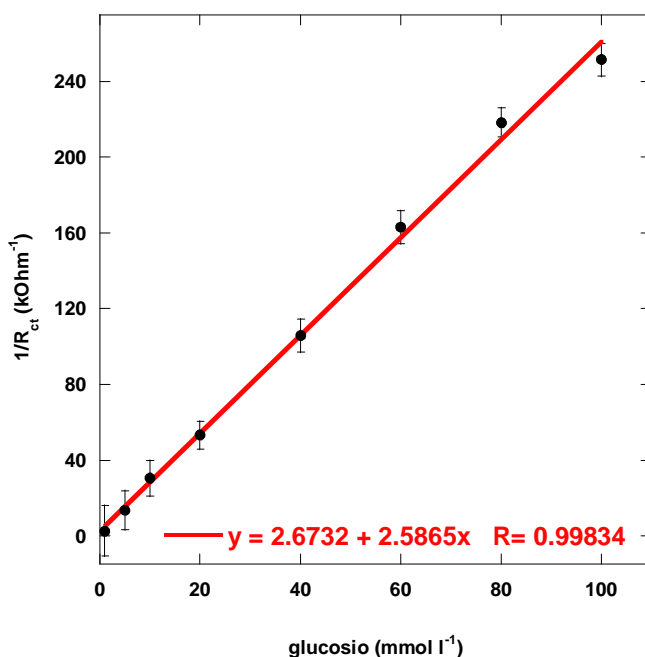


**Figura 68** Spettro di impedenza per il biosensore Pt-AuNTs-OPPy-GOD elettrodepositata con soluzioni di glucosio a concentrazione crescente; potenziale OCV vs Ag/AgCl; intervallo di frequenze da 10kHz a 0.1Hz; range di concentrazione 1-100mmol l<sup>-1</sup>.

dove si vede la diminuzione della  $R_{ct}$ , ad ogni aggiunta di glucosio.

Graficando il valore del reciproco dell' $R_{ct}$ , in funzione della concentrazione del glucosio, si ottiene la retta di calibrazione riportata in figura:





**Figura 69** Grafico della risposta del biosensore Pt-AuNTs-OPPy-GOD elettrodepositata in funzione di concentrazioni crescenti di glucosio.

L'intervallo di linearità (1-100mM) di questo biosensore comprende tutte le concentrazioni di glucosio testate. La deviazione standard è stata calcolata per 5 campioni di AuNTs-OPPy-GOD sintetizzati e testati nelle medesime condizioni sperimentali.

Per valutare la bontà del metodo impedimetrico, il dispositivo è stato studiato anche per via amperometrica mediante aggiunte di 100μl di una soluzione di glucosio 1M, ogni 300-400 secondi, in 10ml di una soluzione di idrochinone (HQ) 2mM in tampone acetato a pH 4.7 con E=0.8V vs Ag/AgCl. L'impiego di HQ si è reso necessario perché è un mediatore elettrochimico che aumenta il charge transfer e la sensibilità nelle analisi. Senza HQ le misurazioni amperometriche non sono significative.

L'amperometria permette di valutare la variazione in corrente quando vengono effettuate delle aggiunte di glucosio che, per azione catalitica dell'enzima viene trasformato in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> che si scarica ossidativamente sui nanotubi al valore del potenziale impostato.

L'andamento di questa risposta è illustrato nel grafico di seguito riportato:

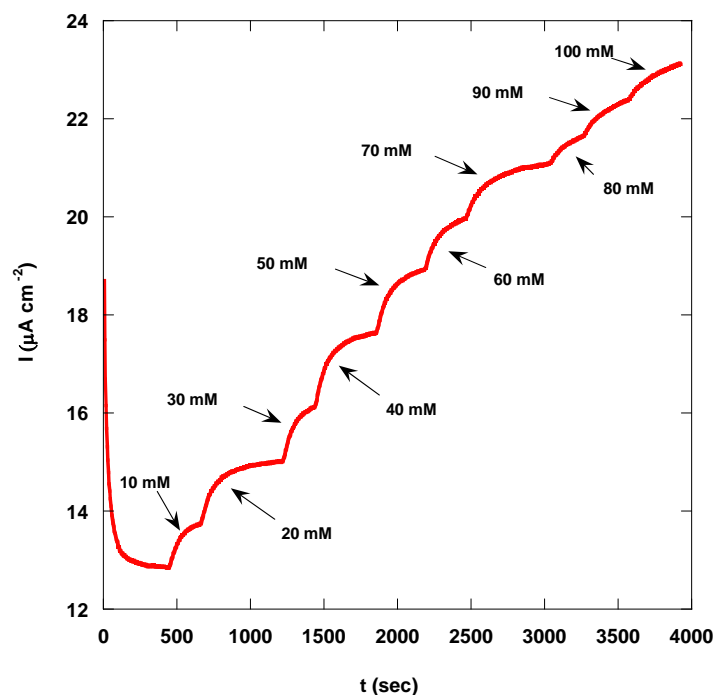


Figura 70 Cronoamperometria del biosensore per il glucosio Pt-AuNTs-OPPy-GOD elettrodepositata; potenziale  $E=0.8V$  vs Ag/AgCl per 4000s; range di concentrazione da 10 a 100mmol  $l^{-1}$ .

Graficando i valori della corrente, corrispondenti alle aggiunte di glucosio, si ottiene l'andamento illustrato in figura:

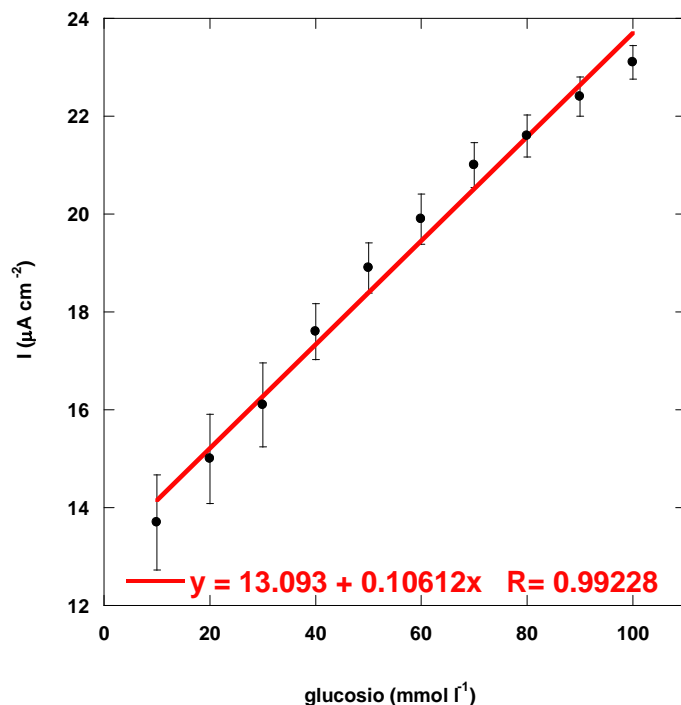


Figura 71 Grafico della risposta in corrente del biosensore Pt-AuNTs-OPPy-GOD in funzione di concentrazioni crescenti di glucosio.

Si può notare una risposta lineare nel range di concentrazione che va da 10 a 100mM. La deviazione standard stata calcolata per 5 campioni di AuNTs-OPPy-GOD sintetizzati e testati nelle medesime condizioni sperimentali.

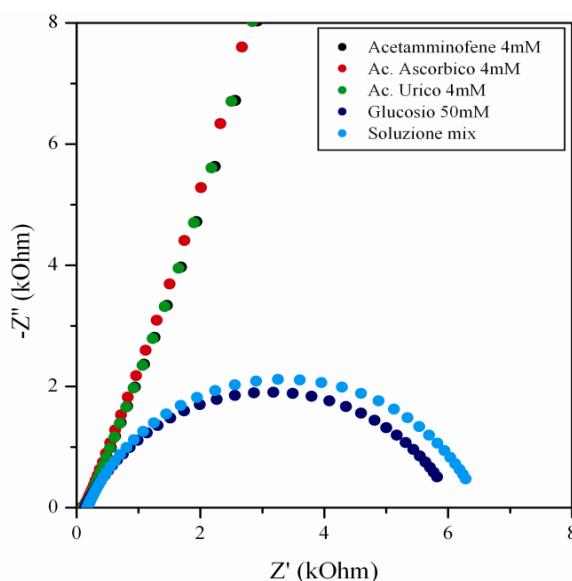
Le caratteristiche dei due metodi e le possibili applicazioni vengono riassunti nella seguente tabella.

**Tabella 8** Tabella riassuntiva delle caratteristiche del metodo impedimetrico e cronoamperometrico per la determinazione del glucosio con Pt/AuNTs-OPPy/GOD.

Metodo	Range di linearità	LOD mmol/l	LOQ mmol/l	RSD (%)	Sensibilità	Durata	Equazione
EIS	1-100mmol/l	0.1	1	7.3	2.59l/kΩ mol	100''	$y=2.59x+2.67$
AMPERO	10-100mmol/l	5	10	3.9	0.11μA l /mol cm <sup>2</sup>	120''	$y=0.11x+13.09$
Utilità	Determinazione del glucosio nel sangue intero o nel siero per pazienti sani o affetti da iperglicemia e/o diabete in quanto i livelli fisiologici di questo zucchero nel sangue sono compresi tra 3.3-3.9mmol/l per soggetti sani e a digiuno e maggiori di 6.7mmol/l per soggetti iperglicemi e/o diabetici.						

Il biosensore è stato testato anche in presenza di alcuni interferenti, come acetamminofene, acido ascorbico e acido urico, per valutare l'andamento di  $R_{ct}$  quando questi sono presenti in soluzione prima singolarmente e poi tutti insieme in una soluzione di tampone fosfato a pH 7.

Il grafico relativo a questa analisi impedimetrica è il seguente:



**Figura 72** Spettri di impedenza relativi alla reazione di trasferimento di carica di diverse soluzioni: acetamminofene, acido ascorbico, acido urico, glucosio e una soluzione contenente tutti e quattro i precedenti composti. Potenziale all'OCV vs Ag/AgCl. Range di frequenza compreso tra 10kHz e 0.1Hz.

Per gli interferenti si può notare l'assenza di un semicerchio riconducibile alla loro reazione di trasferimento di carica. Questo è possibile grazie alle condizioni sperimentali in quanto l'analisi è condotta ad un valore di potenziale pari all'OCV (0.23V vs Ag/AgCl) che è ben lontano dai potenziali ossidativi delle specie interferenti; mentre è ben visibile il semicerchio relativo alla reazione di trasferimento di carica di  $\text{H}_2\text{O}_2$  prodotta dall'attività catalitica della GOD sul glucosio anche quando questo è presente contemporaneamente agli altri tre composti.

Possiamo perciò concludere che il biosensore risponde bene al glucosio e non risente della presenza degli interferenti, come si può vedere dalle  $R_{ct}$  nel grafico riportato in figura. Questo dimostra come la tecnica di immobilizzazione sia efficace e il dispositivo fornisca una risposta sensibile.

### 8.5 Poli(3,4-etilendioksi)tiofene: condizioni sperimentali

Uno strato di PEDOT è stato ottenuto elettrochimicamente su un elettrodo di platino mediante un'unica tecnica galvanostatica [195] applicata in due diverse condizioni sperimentali ed in particolare in un caso è stato utilizzato come elettrolita di supporto una soluzione acquosa di polistirensulfonato sodico (NaPSS), il quale svolge il doppio ruolo di condurre la corrente nella cella elettrochimica e di surfattante per l'EDOT altrimenti insolubile in acqua. Nel secondo caso è stato usato come elettrolita di supporto per la sintesi, il solo liquido ionico  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$  che, come il PSS, svolge il doppio ruolo di supportare la corrente e di solvente per l'EDOT durante tutto il processo sintetico. Nel caso della sintesi in soluzione acquosa contenente EDOT 0.01M e PSS 0.1M è stato utilizzato un elettrodo di riferimento combinato di  $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}$  3M; invece per la sintesi in liquido ionico  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$  con EDOT 0.1M è stata utilizzata una cella a tre elettrodi con una barra di Ag come pseudoreference. La concentrazione del monomero usata in liquido ionico è stata di un ordine di grandezza superiore (0.1M) rispetto a quella in soluzione acquosa (0.01M) poiché tale elettrolita di supporto, avendo una viscosità elevata, è un ostacolo alla polimerizzazione stessa. Tale limite cinetico viene, pertanto, superato aumentando la quantità di monomero così da aumentare la probabilità di interazione tra i radical-cationi, inizialmente, e i vari oligomeri, successivamente, che si formano durante il processo ossidativo. In entrambi i casi, all'elettrodo di lavoro è stata applicata una densità di corrente pari a  $0.2\text{mA}/\text{cm}^2$  per 500 secondi lavorando a  $T_{\text{amb}}$ .

La deposizione mediante metodo galvanostatico ( $i=\text{cost.}$ ) ha permesso di ottenere un film polimerico ben aderente alla superficie del Pt tale da renderlo indicato per la realizzazione di un dispositivo analitico utile in campo sensoristico.

Infatti, una volta sintetizzati i due polimeri, PEDOT-PSS e PEDOT- $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$ , sono stati caratterizzati attraverso tecniche elettrochimiche, come la voltammetria ciclica (VC), la voltammetria differenziale ad impulsi (DPV) e la spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS), per indagare le proprietà chimico-fisiche, l'attività elettrica e la resistenza meccanica di questo polimero al fine di poterne valutare la futura applicabilità come strumento analitico. In particolare è stata valutata la sua utilità per il dosaggio di sostanze biologiche quali alcuni dei neurotrasmettitori endogeni e alcuni

tipici metaboliti presenti nei fluidi biologici quali plasma, urina e saliva. Lo studio per la determinazione analitica verrà, successivamente, focalizzato sulle seguenti sostanze: per quanto riguarda i neurotrasmettitori verranno utilizzati il catecolo, come capostipite di suddetta classe, l'epinefrina, la dopamina e la serotonina e per quanto riguarda i comuni metaboliti verranno effettuati i test con acetamminofene, acido ascorbico, l'acido urico, l'acido caffeico e il NADH.

A tal fine il PEDOT-PSS, dopo la sintesi, è stato trattato per VC per 10 cicli in soluzione di PSS 0.1M effettuando la scansione nel range di potenziale compreso tra -0.8V e +0.5V vs Ag|AgCl con una velocità di 20mV/s. Sempre sul PEDOT-PSS è stata effettuata una scansione per VC per 20 cicli in NaCl 0.2M nel range di potenziale compreso tra -0.8V e +0.5V vs Ag|AgCl con una velocità di scansione di 20mV/s e per 20 cicli in NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M (TF a pH 7) nel range di potenziale compreso tra -0.3V e +0.7V vs Ag|AgCl con una velocità di 20mV/s a T<sub>amb</sub>.

Analogamente il PEDOT-PYR<sub>14</sub>TFSI, dopo la sintesi, è stato trattato per VC per 20 cicli nel solo liquido ionico effettuando la scansione nel range di potenziale compreso tra -1.0V e +1.0V vs Ag<sub>pseudoref</sub> con una velocità di 50mV/s. Anche in questo caso per il PEDOT-PYR<sub>14</sub>TFSI è stata effettuata una scansione per VC per 20 cicli in NaCl 0.2M nel range di potenziale compreso tra -0.8V e +0.5V vs Ag|AgCl con una velocità di 20mV/s e per 20 cicli in NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M (T.F. a pH 7) nel range di potenziale compreso tra -0.3V e +0.7V vs Ag|AgCl con una velocità di 20mV/s sempre a T<sub>amb</sub>.

I due polimeri sono stati caratterizzati morfologicamente mediante SEM per valutare le differenze strutturali dovute all'influenza dell'elettrolita di supporto utilizzato per l'elettropolimerizzazione.

In seguito, entrambi i materiali sono stati sottoposti ad una preliminare caratterizzazione elettrochimica per mezzo della spettroscopia di impedenza e della voltammetria ciclica per valutare la resistenza al trasferimento di carica, in un caso, e la corrente di picco, nell'altro, di due tipici probe elettrochimici, quali Fe<sup>+2</sup>/Fe<sup>+3</sup> e Ru<sup>+2</sup>/Ru<sup>+4</sup> per valutare le proprietà elettriche di questi due materiali.

Questo studio preliminare di entrambi i polimeri depositati sul Pt si è reso necessario per capire se questi sono adatti all'uso analitico mediante VC o EIS per la successiva determinazione di vari neurotrasmettitori e metaboliti endogeni precedentemente

citati e per poter indagare il loro ruolo nella cinetica della scarica redox di suddette sostanze.

Lo studio è stato effettuato per mezzo della voltammetria ciclica nelle soluzioni dei vari analiti di interesse biologico e questo è stato finalizzato ad un confronto tra il PEDOT cresciuto in liquido ionico e quello cresciuto in soluzione acquosa. Quest'ultimo ha dimostrato di avere migliori proprietà elettrochimiche e tutto il successivo studio analitico è stato effettuato su tale materiale.

## 8.6 Poli(3,4-etilendioksi)tiofene: risultati e discussione

La risposta in potenziale  $E$  (V) contro il tempo (s) relativa all'elettrosintesi del PEDOT mediante trattamento galvanostatico ha un diverso profilo a seconda dell'elettrolita di supporto utilizzato.

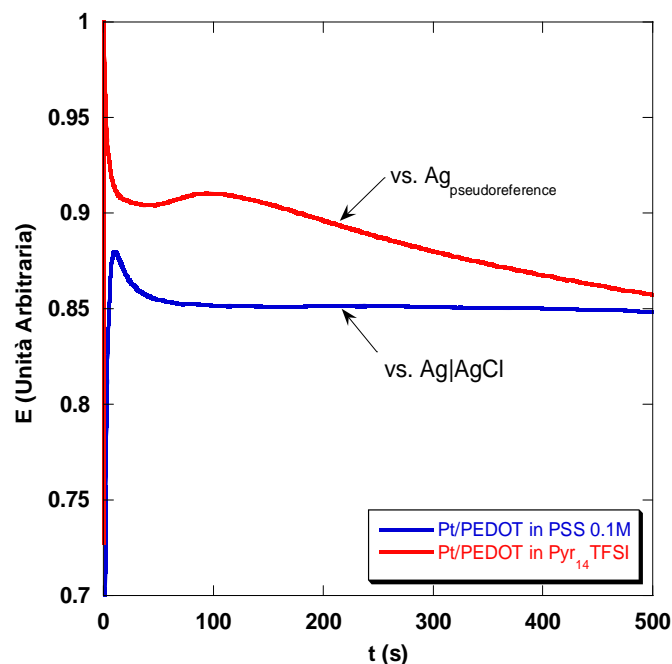


Figura 73 Profilo della corrente per la sintesi del PEDOT in mezzo acquoso e in liquido ionico  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$ .  $I=0.2\text{mA}/\text{cm}^2$  per  $t=500\text{s}$ .

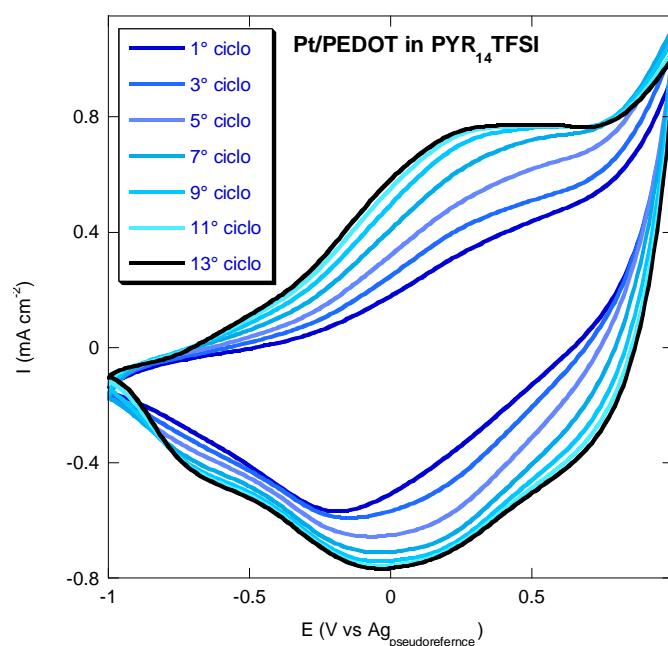
In figura 73, infatti, si vede come la sintesi, sia in PSS acquoso che in  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$ , è caratterizzata da un iniziale picco che corrisponde all'ossidazione dei monomeri presenti all'interfase elettrochimica. La successiva diminuzione del potenziale verso un valore di plateau si ha a seguito della diffusione verso il bulk della soluzione delle specie radical-cationiche appena formate per un processo di diffusione secondo il loro gradiente di concentrazione. Di conseguenza si attivano due processi dovuti uno alla diffusione di nuovi monomeri verso l'interfase elettrochimica dove, una volta giunti, si ossidano a radical-cationi e nuovamente diffondono via e l'altro dovuto alla contemporanea dimerizzazione delle specie radicaliche appena formate in quanto particolarmente reattive. Quando nell'intorno dell'interfase elettrochimica si ha una concentrazione di radical-cationi monomerici, dimerici e oligomerici tale che non sarà più possibile la rapida diffusione di molecole dal bulk della soluzione e viceversa (a



causa degli impedimenti sterici delle molecole in accrescimento) si ha l'inizio della polimerizzazione vera e propria.

In figura 73 non è stato riportato in scala il valore del potenziale poiché le due curve si riferiscono a due diversi elettrodi di riferimento: Ag|AgCl per la sintesi acquosa e  $\text{Ag}_{\text{pseudoreference}}$  per la sintesi in liquido ionico.

La sintesi in liquido ionico, rispetto a quella effettuata in soluzione acquosa di PSS, è ulteriormente impedita dalla maggiore viscosità del mezzo elettrolitico nel quale essa viene condotta. Infatti, le varie specie chimiche presenti all'interfase, per diffondere sia dal bulk della soluzione che verso di esso, hanno bisogno di una maggiore energia, come dimostrato dal valore del potenziale di picco e quello immediatamente successivo, che sono superiori a quello necessario per la polimerizzazione in PSS. Il potenziale di polimerizzazione del PEDOT in  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$  inizialmente si mantiene più elevato rispetto a quello del PSS anche a causa della difficoltà che gli ioni, pirrolidinio e sulfonilimide, hanno nel muoversi secondo gradiente di potenziale e di concentrazione. Di conseguenza si avrà la formazione di un polimero parzialmente rigonfio degli ioni del liquido ionico poiché essi rimangono intrappolati nella sua ossatura durante il processo sintetico. Ad ulteriore dimostrazione di quanto appena detto si vedano le figure 74 e 75.



**Figura 74** Voltammetria ciclica del PEDOT, sintetizzato in liquido ionico  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$ , effettuata nello stesso liquido ionico libero dal monomero. Range di potenziale  $-1\text{V} < E \text{ vs } \text{Ag}_{\text{pseudoreference}} < +1\text{V}$ ; velocità di scansione  $50\text{mV/s}$  per 20 cicli.

Infatti, in figura 74 sono stati riportati alcuni cicli della scansione di VC effettuata per il PEDOT-PYR<sub>14</sub>TFSI nello stesso liquido ionico libero dal monomero [196]. Come si può notare si ha un graduale aumento della densità della corrente di picco anodico a circa 0.3V vs Ag<sub>pseudoref</sub> dovuta presumibilmente ad un rapido aumento degli spin polaronici e ciò coincide con l'inizio dell'ossidazione del polimero. Contemporaneamente avvengono anche dei riarrangiamenti delle catene di polimero che costituiscono la membrana appena depositata sul Pt. Ciò crea dei varchi nella membrana che consentono lo scambio degli ioni dell'elettrolita fino ad una condizione oltre la quale la membrana diventa stabile e il processo di scambio ionico si mantiene costante. Questo fenomeno di "attivazione" della matrice polimerica arriva ad una condizione oltre la quale la membrana non subisce più nessun tipo di riarrangiamento e di processo redox. La stabilizzazione della corrente anodica intorno al valore di potenziale pari a +0.6V potrebbe indicare che i polaroni appena formati cominciano ad apparirsi per generare i bipolaroni privi di spin. Nella metà curva catodica della voltammetria ciclica avviene la riduzione del PEDOT con diminuzione del numero dei polaroni e bipolaroni. Questo fenomeno avviene in due tempi come si può notare dai due picchi molto allargati nella zona di potenziale intorno a 0V e a -0.5V. Ciò implica che il processo di riduzione (sdrogaggio) del polimero avviene per step successivi. Questo può significare che l'espulsione dei controioni anionici è più difficoltosa, rispetto all'ingresso durante l'ossidazione, e ciò può essere spiegato illustrando il corso del processo riduttivo il quale comincia sulla superficie dell'elettrodo e si propaga negli stati del polimero più lontani dalla superficie del Pt. Infatti, se la membrana del PEDOT è sufficientemente aderente alla superficie metallica del Pt, gli anioni, che dovrebbero essere espulsi dal materiale polimerico ridotto (neutro), possono, invece, rimanere intrappolati in tale struttura, ritardando ulteriormente la riduzione del restante materiale.

Il processo di attivazione del PEDOT-PYR<sub>14</sub>TFSI, a seguito dello scambio dei contro-ioni (PYR<sub>14</sub><sup>+</sup> e TFSI<sup>-</sup>) durante la voltammetria ciclica nel solo liquido ionico, può essere confermato dal grafico relativo alla quantità di carica scambiata dal polimero durante la ciclazione (come riportato in figura 75).

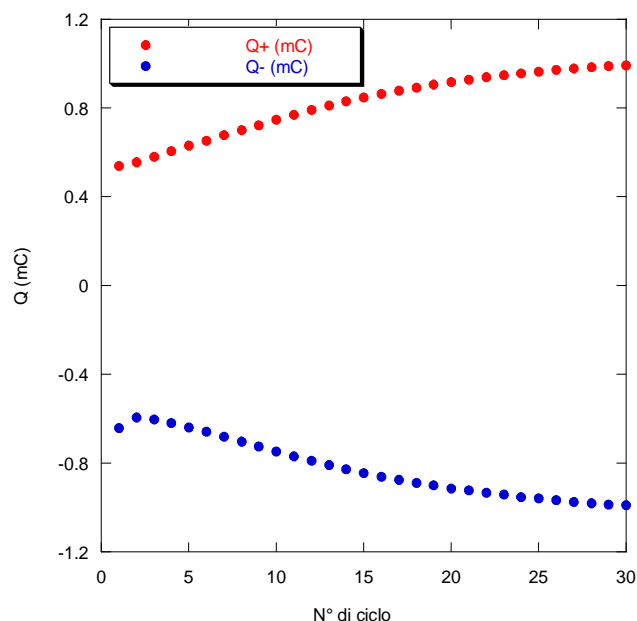


Figura 75 Grafico relativo alla carica scambiata durante la voltammetria ciclica riportata in figura 74.

Infatti in tale grafico si può notare come la quantità di carica scambiata, in fase di ossidazione e di riduzione, aumenta (in valore assoluto) fino ad un plateau identificabile con la stabilizzazione della matrice polimerica.

La figura 76 rappresenta la VC del PEDOT-PYR<sub>14</sub>TFSI effettuata in NaCl 0.2M e dimostra come si verifichi lo stesso fenomeno di scambio ionico precedentemente citato anche se in modo più complesso.

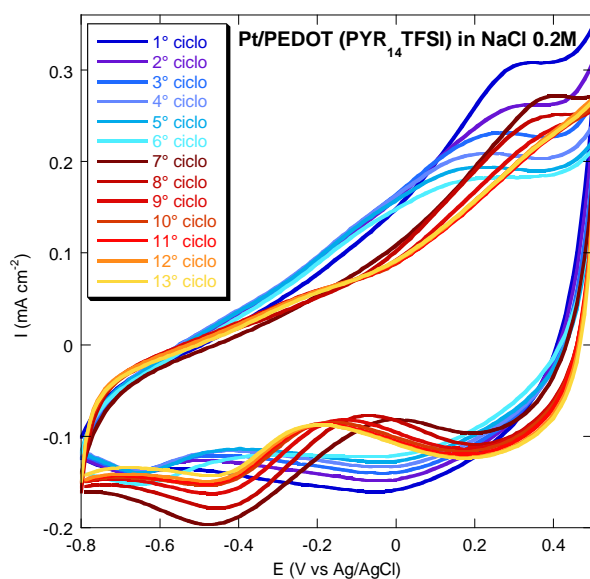
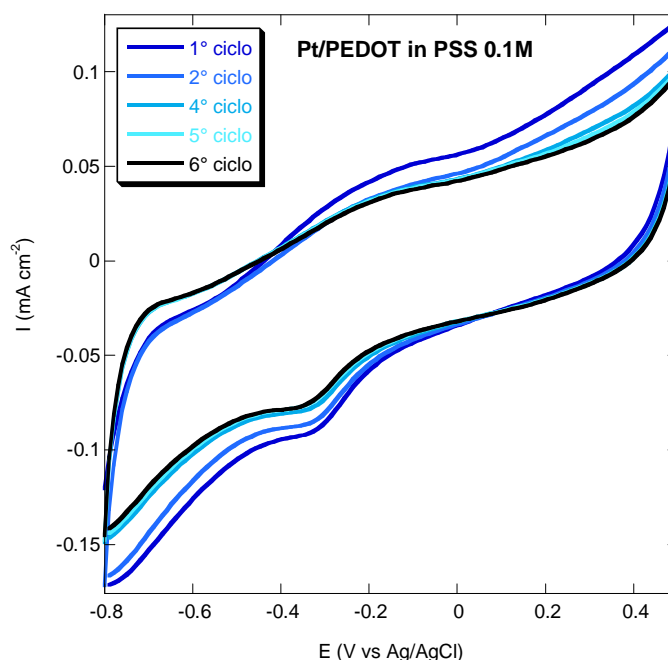


Figura 76 Voltammetria del PEDOT sintetizzato in liquido ionico PYR<sub>14</sub>TFSI in una soluzione di NaCl 0.2M. Range di potenziale  $-0.8V < E \text{ vs Ag} | \text{AgCl} < +0.5V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 20 cicli.

Infatti, i primi cicli riportati in azzurro mostrano una graduale diminuzione della densità della corrente del picco anodico a circa +0.27V (nel caso del processo ossidativo) e della corrente del picco catodico a circa 0.0V (nel caso del processo riduttivo) corrispondenti all'uscita irreversibile dell'anione e del catione del liquido ionico rimasti intrappolati nell'ossatura del polimero durante il processo di sintesi e ora scambiati con  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  durante questa fase di assestamento della membrana aderente al Pt. I successivi cicli riportati in rosso-arancio mostrano un analogo andamento dovuto allo scambio degli ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , abbondanti nella soluzione nella quale viene condotta la VC, fino ad un valore al quale l'attività del polimero si mantiene costante.

Il PEDOT elettrosintetizzato in soluzione acquosa di PSS 0.1M, analogamente, è stato sottoposto dopo la sintesi ad una scansione di VC, nella stessa soluzione acquosa del solo elettrolita di supporto e libera dal monomero, per metterne in evidenza la sua attività elettrochimica. Infatti, dalla figura 77 si notano un picco catodico ben evidente a circa -0.35V e un picco anodico appena accennato e molto allargato nella zona di potenziale compresa tra -0.4V e +0.1V e relativi allo scambio del catione  $\text{Na}^+$  all'interfase Pt-PEDOT/PSS. Ciò è dovuto al fatto che il PEDOT si trova in intimo contatto con il polianione  $\text{PSS}^{n-}$  il quale non ha mobilità durante la ciclazione a causa del suo elevatissimo ingombro sterico. Per cui  $\text{Na}^+$  è l'unica specie chimica in grado di diffondere sia verso che dalla superficie dell'elettrodo secondo il potenziale applicato durante ogni ciclazione grazie alle sue ridotte dimensioni se paragonate a quelle del suo contro ione  $\text{PSS}^{n-}$  che invece risulta bloccato nella struttura del polimero ed intimamente accoppiato ad esso.

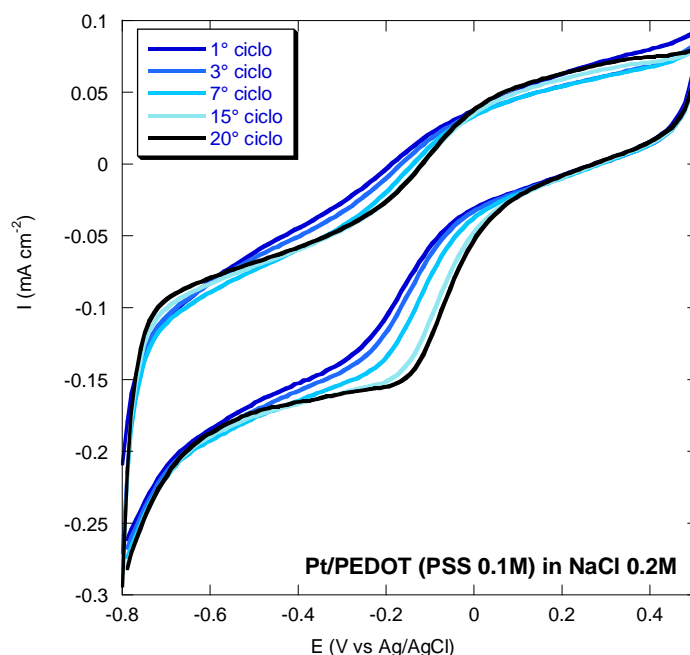


**Figura 77** Voltammetria del PEDOT, sintetizzato in soluzione acquosa di PSS 0.1M, nella stessa soluzione di PSS libera dal monomero. Range di potenziale  $-0.8V < E \text{ vs Ag|AgCl} < +0.5V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 20 cicli.

Il voltammogramma in figura 77 dimostra anche che, diversamente da quanto accade per il PEDOT elettrosintetizzato in liquido ionico, quello ottenuto in PSS mostra un unico processo di drogaggio (con formazione delle specie polaroniche e, successivamente, bipolaroniche) in una zona di potenziale poco definita e compresa tra  $-0.4V$  e  $+0.1V$ , e un unico processo di sdrogaggio intorno a circa  $-0.35V$ . I processi elettrochimici sono sostenuti presumibilmente dai moti diffusivi da e verso la soluzione dello ione  $Na^+$  poiché è l'unica specie in grado di diffondere liberamente attraverso la matrice polimerica durante le fasi di polarizzazione e depolarizzazione. Infatti, lo ione  $PSS^{n-}$  come contro ione polimerico del PEDOT si troverà in intimo contatto con esso senza possibilità di movimento. Infatti, la reazione di ossidazione del PEDOT-PSS in soluzione di PSS procederà nel seguente modo:



Ad ulteriore conferma di quanto appena detto, il polimero PEDOT-PSS è stato fatto ciclare, appena dopo la sintesi, in una soluzione di NaCl 0.2M per mettere in evidenza lo scambio dello ione  $Na^+$ . Infatti, si nota in figura 78 un picco catodico a circa  $-0.2V$  che diviene più evidente con il procedere del trattamento elettrochimico e un picco anodico meno pronunciato a circa  $0V$ .



**Figura 78** Voltammetria ciclica del PEDOT, sintetizzato in soluzione acquosa di PSS, in soluzione di NaCl 0.2M. Range di potenziale  $-0.8V < E \text{ vs Ag|AgCl} < +0.5V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 20 cicli.

Il comportamento elettrochimico di entrambi i polimeri, PEDOT-PYR<sub>14</sub>TFSI e PEDOT-PSS è stato studiato con un'ulteriore analisi per VC in soluzione di TF a pH 7. Il trattamento elettrochimico, come riportato in figura 79, ha messo in evidenza che per il polimero cresciuto in PYR<sub>14</sub>TFSI vi è un andamento simile a quello riscontrato nella VC in NaCl e cioè presenta un iniziale scambio degli ioni dello stesso liquido ionico i quali diffondono irreversibilmente verso il bulk della soluzione, come si vede nel primo ciclo con un picco broad a circa +0.2V; nei cicli successivi si ha un graduale aumento della corrente catodica a circa +0.1V dovuta allo scambio dell' $\text{Na}^+$  sulla superficie dell'elettrodo modificato.

Anche il PEDOT-PSS, come riportato in figura 80, nella VC in T.F. a pH 7 conferma il comportamento precedentemente evidenziato in soluzione di PSS 0.1M e di NaCl 0.2M. Si evidenzia uno scambio di ioni  $\text{Na}^+$  che aumenta gradualmente con il procedere della ciclazione fino ad un valore costante che corrisponde alla stabilizzazione del processo di riduzione del polimero sostenuto dallo scambio dello ione  $\text{Na}^+$  nella zona catodica di potenziale intorno a +0.15V.

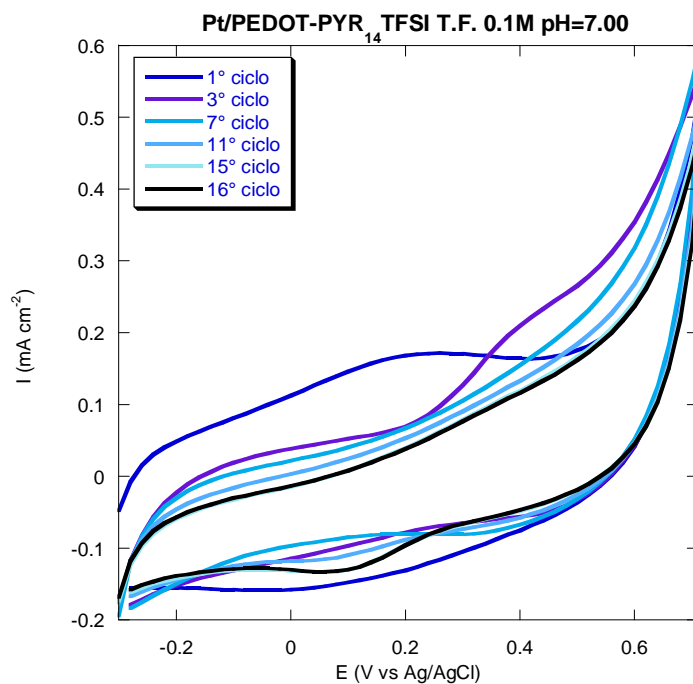


Figura 79 Voltammetria ciclica del PEDOT sintetizzato in liquido ionico  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$  in soluzione di tampone fosfato 0.1 M a pH 7. Range di potenziale  $-0.8\text{V} < E \text{ vs Ag|AgCl} < +0.5\text{V}$ ; velocità di scansione 20mV/s per 20 cicli.

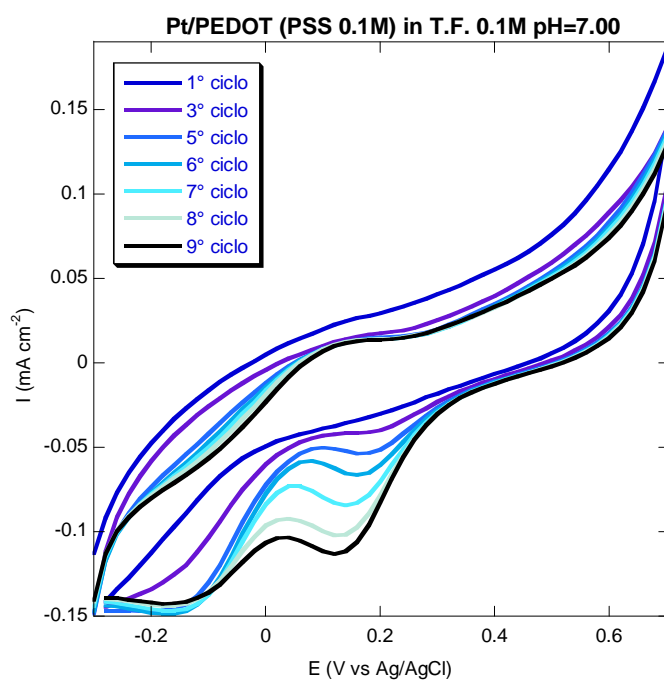
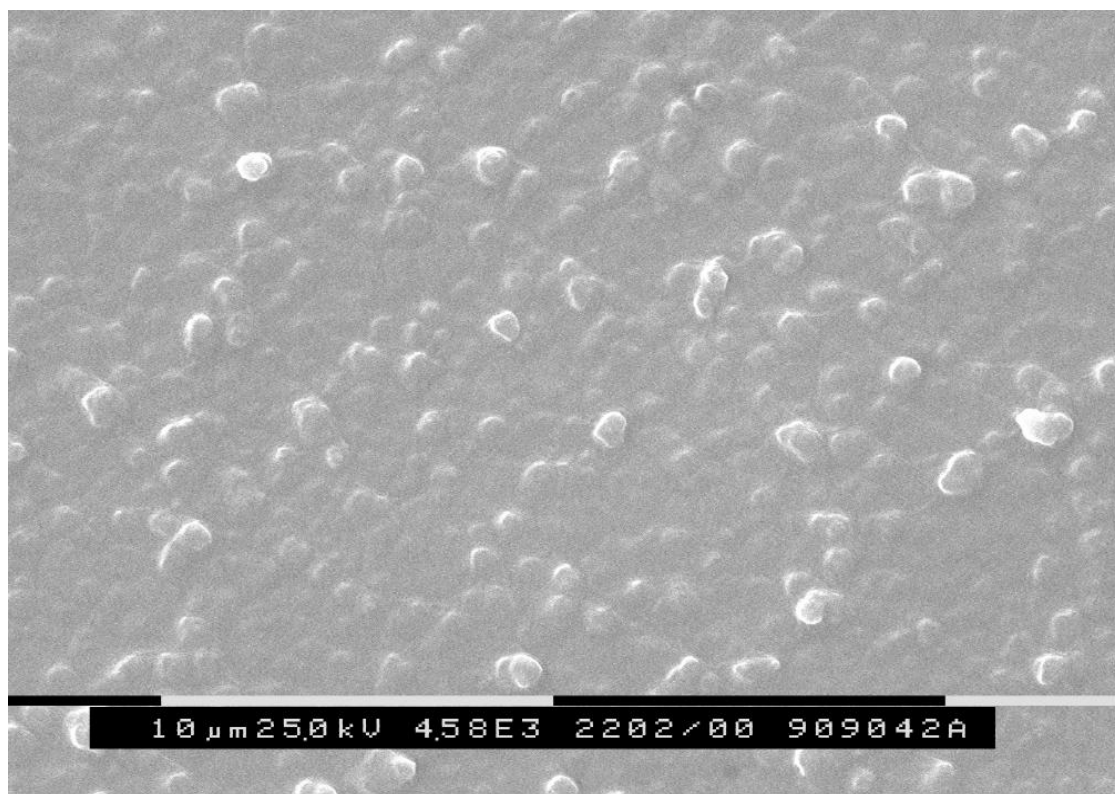


Figura 80 Voltammetria ciclica del PEDOT sintetizzato in PSS acquoso in soluzione di tampone fosfato 0.1 M a pH 7. Range di potenziale  $-0.8\text{V} < E \text{ vs Ag|AgCl} < +0.5\text{V}$ ; velocità di scansione 20mV/s per 20 cicli.

Lo studio della reattività elettrochimica dei due polimeri è stato necessario per indagare, in via preliminare, la possibilità di poter ottenere un dispositivo analitico in grado di permettere il dosaggio di alcune molecole di interesse biologico.

Lo studio della morfologia dei campioni di PEDOT-PYR<sub>14</sub>TFSI e PEDOT-PSS è stato effettuato anche mediante analisi SEM allo scopo di poter mettere in luce le eventuali differenze strutturali che possono derivare dalle diverse condizioni sperimentali utilizzate per il processo di sintesi. Per quanto riguarda il polimero cresciuto in liquido ionico, di seguito viene riportata l'immagine SEM:



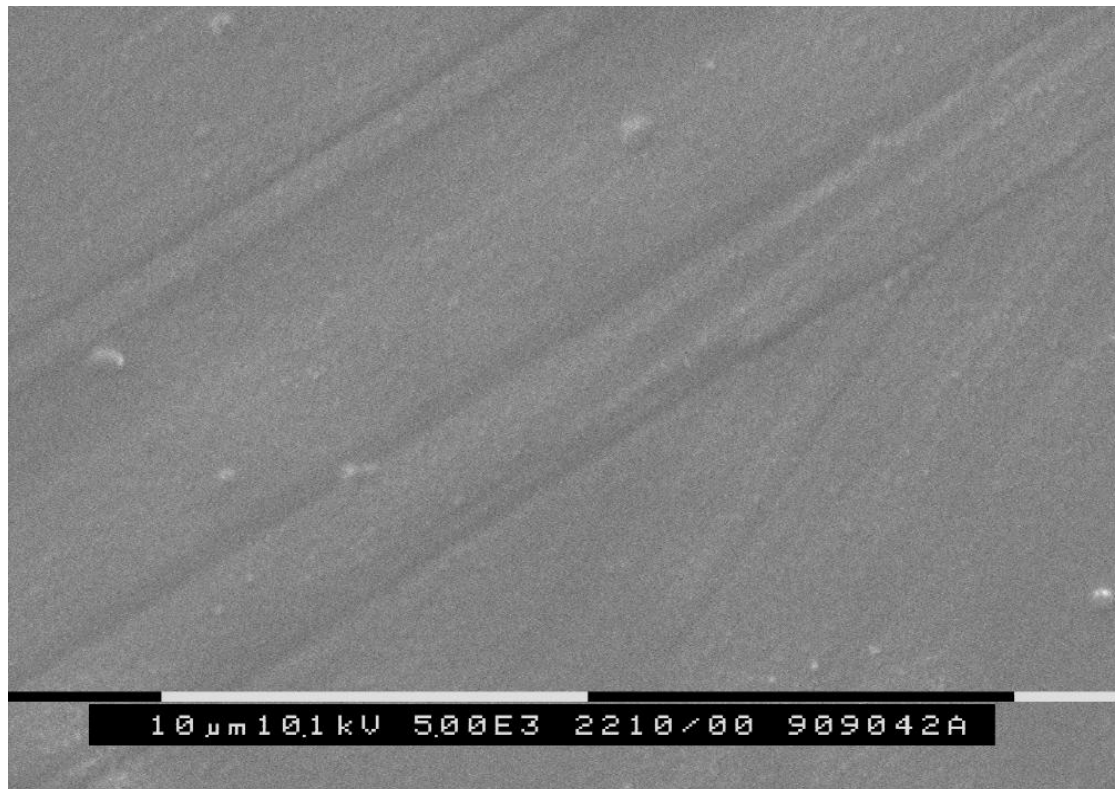
**Figura 81 SEM del PEDOT cresciuto in PYR<sub>14</sub>TFSI.**

La matrice del polimero appare granulare, omogenea e bene aderente alla superficie del platino. Come si può notare nel SEM del polipirrolo (PPy) in figura 45, anche quello del PEDOT, in figura 81, mostra dei rigonfiamenti. Tali strutture si presume possano essere attribuibili al particolare tipo di accrescimento del polimero nel liquido ionico. Infatti, a causa della elevata viscosità di quest'ultimo, si può ipotizzare una più lenta diffusione dei monomeri all'elettrodo di lavoro che consente la formazione di centri di nucleazione che fanno da punto di partenza per l'accrescimento del polimero.



Dall'osservazione della foto SEM sono visibili tali strutture globulari uniformemente distribuite su tutta la superficie.

Per quanto riguarda il PEDOT cresciuto in soluzione acquosa di PSS, di seguito viene riportato il SEM corrispondente:

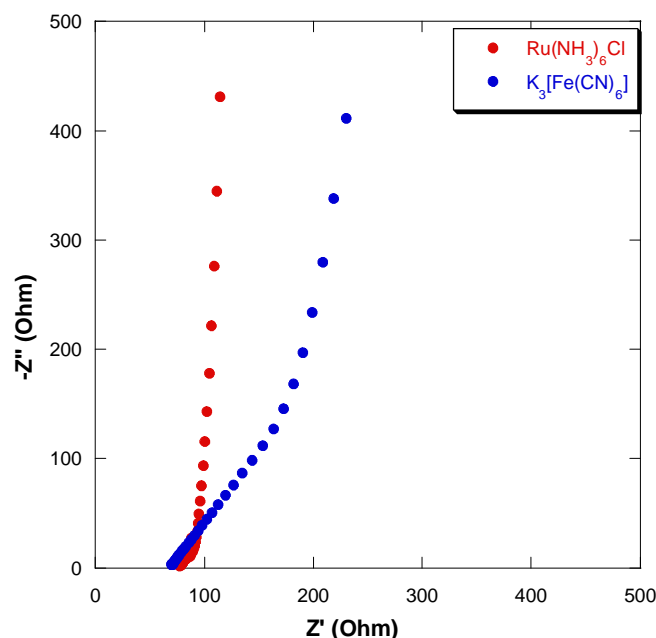


**Figura 82 SEM del PEDOT cresciuto in soluzione acquosa di PSS.**

In questo caso la matrice polimerica appare priva di qualsiasi struttura globulare e questo sembra attribuibile ad una elevata cinetica di deposizione favorita dalla soluzione acquosa contenente NaPSS che come surfattante garantisce una soluzione di sintesi di viscosità trascurabile. Come si può notare il polimero è molto omogeneo e non presenta strutture di alcun tipo. Per questi due materiali a base di PEDOT, sono in corso di studi, nel nostro laboratorio, altre analisi SEM per indagare le variazioni morfologiche e della composizione elementare dovute ai trattamenti elettrochimici necessari per il loro utilizzo come dispositivi sensoristici.

Sfortunatamente la caratterizzazione elettrochimica per mezzo della spettroscopia di impedenza effettuata per il polimero PEDOT-PSS nelle soluzioni di  $K_3Fe(CN)_6$  e di  $Ru(NH_3)_6Cl_3$  non ha portato a risultati utili ai fini della possibile applicazione in campo sensoristico mediante questa tecnica [197]. Dal diagramma di Nyquist di seguito

riportato in figura 83, infatti, possiamo vedere che non è possibile distinguere il semicerchio relativo all'interfase elettrochimica poiché il processo di trasferimento di carica è così veloce da non essere distinguibile dalla resistenza dell'elettrolita.



**Figura 83** Spettroscopia di impedenza elettrochimica per l'elettrodo modificato con PEDOT-PSS. Condizioni di circuito aperto; range di frequenza: 10kHz-0.01Hz.

Pensiamo che questo comportamento sia legato al basso band gap (differenza di energia tra gli orbitali di conduzione e quelli di valenza) del PEDOT che conferisce al polimero un comportamento metallico (bassissimi valori di resistenza). L'analisi di impedenza effettuata sul PEDOT-PYR<sub>14</sub>TFSI nelle medesime condizioni sperimentali non ha prodotto dati significativi, che non vengono quindi riportati, probabilmente a causa dell'interferenza degli ioni del liquido ionico rimasti bloccati nella matrice polimerica e che creano disturbo all'interfase elettrochimica durante l'analisi. Mediante voltammetria ciclica si apprezzano, invece, i grafici sia per l'anione ferricianuro sia per il catione esamminorutenio e relativi al loro comportamento redox. In figura 84 e 85, vengono riportati i voltammogrammi relativi all'analisi effettuata sia sul PEDOT-PYR<sub>14</sub>TFSI che su PEDOT-PSS per le due specie chimiche.

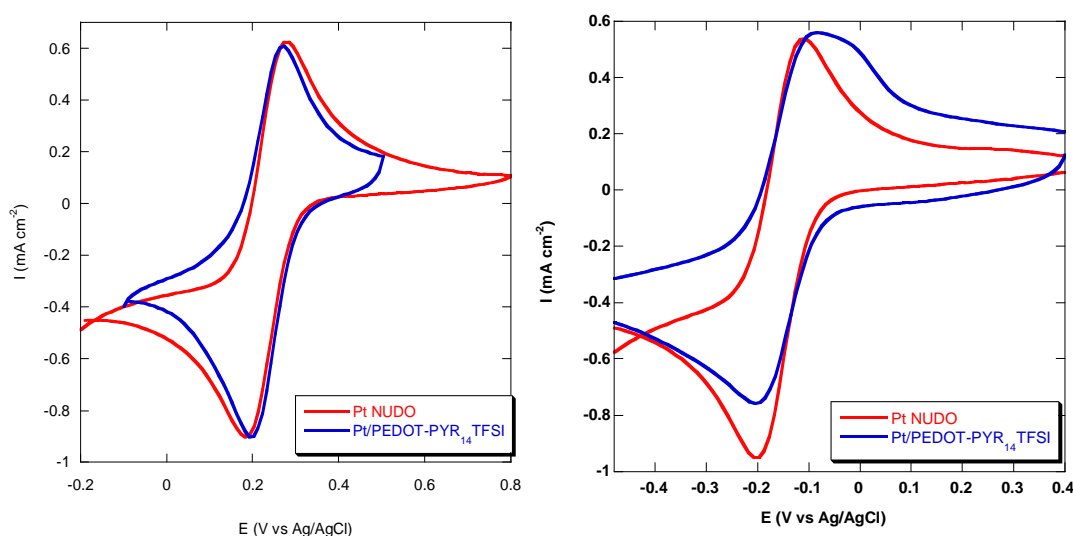


Figura 84 Voltammetria ciclica in soluzione acquosa di  $K_3[Fe(CN)_6]$  (a sinistra) e di  $Ru(NH_3)_6Cl_3$  (a destra). Il PEDOT utilizzato è quello ottenuto in  $PYR_{14}TFSI$ . Range di potenziale  $-0.2V < E$  vs  $Ag|AgCl < +0.8V$  per  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $-0.5V < E$  vs  $Ag|AgCl < +0.4V$  per  $Ru(NH_3)_6Cl_3$ ; velocità di scansione  $20mV/s$  per 2 cicli.

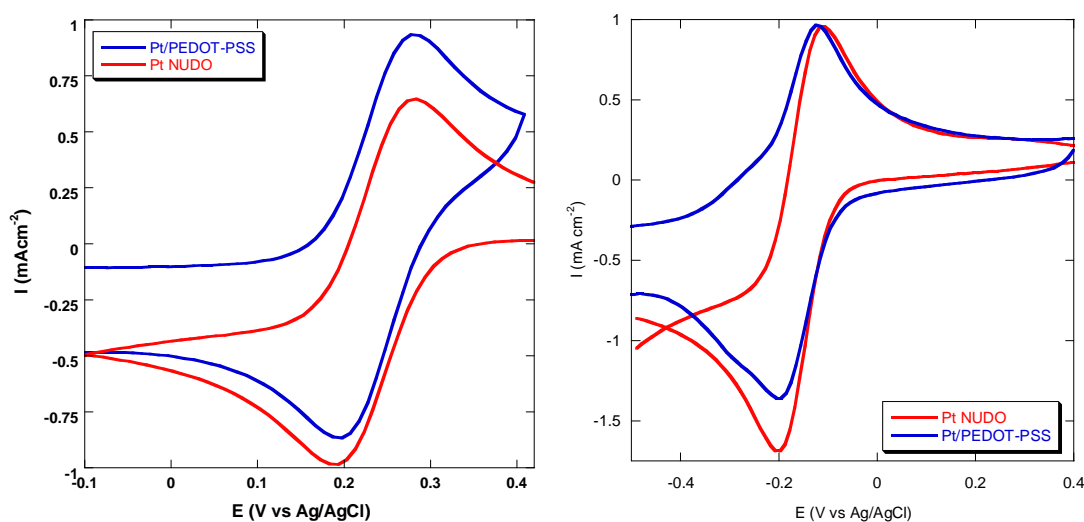


Figura 85 Voltammetria ciclica in soluzione acquosa di  $K_3[Fe(CN)_6]$  (a sinistra) e di  $Ru(NH_3)_6Cl_3$  (a destra). Il PEDOT utilizzato è quello ottenuto in soluzione acquosa di PSS 0.1M. Range di potenziale  $-0.1V < E$  vs  $Ag|AgCl < +0.4V$  per  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $-0.5V < E$  vs  $Ag|AgCl < +0.4V$  per  $Ru(NH_3)_6Cl_3$ ; velocità di scansione  $20mV/s$  per 2 cicli.

Le curve per il PEDOT cresciuto in soluzione acquosa di PSS sono del tutto analoghe a quelle cresciute in liquido ionico  $PYR_{14}TFSI$ . La reazione redox dei probe elettrochimici per i due diversi materiali risulta bene evidente per mezzo della voltammetria ciclica e, quindi, questo lascia aperta la strada per l'uso di tali polimeri nella progettazione di sensori voltammetrici.

In tal senso sono state effettuate su entrambi i polimeri, sia quello cresciuto in PSS acquoso sia in  $PYR_{14}TFSI$ , delle analisi per voltammetria ciclica per studiarne la risposta

agli analiti elencati in questa tesi per valutare quale dei due polimeri meglio si adatta allo scopo di questo lavoro.

Qui di seguito vengono riportati tutti voltammogrammi relativi a questo studio:

- L'**acetamminofene**, mediante voltammetria ciclica in soluzione tampone a pH 7, perde due elettroni e due protoni ad un valore di potenziale pari a circa +0.6V vs. Ag|AgCl, portando alla formazione di N-acetil-*p*-benzochinonimmina che in ambiente acquoso idrolizza facilmente a *p*-benzochinone e a acetaldeide secondo lo schema di seguito illustrato [198-200]:

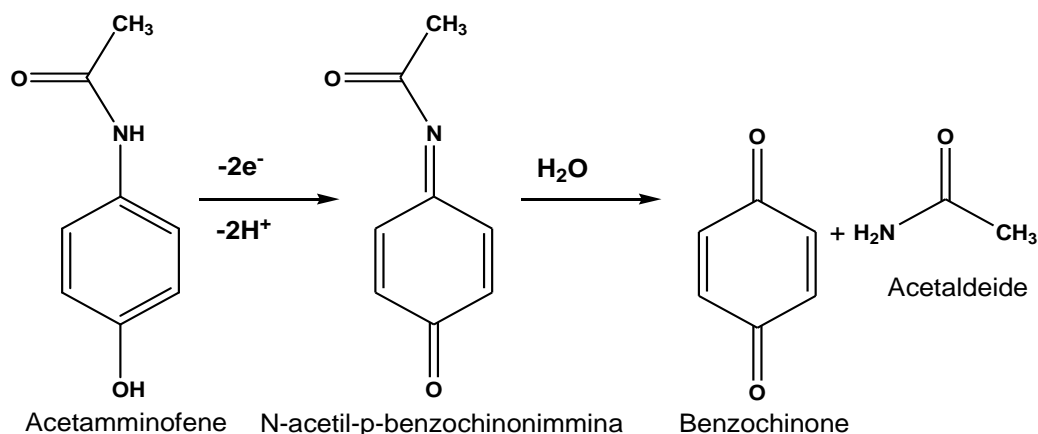


Figura 86 Schema di ossidoriduzione elettrochimica dell'acetamminofene.

Dal voltammogramma riportato in figura 87 si nota come entrambi i polimeri di PEDOT abbassino la sovratensione dell'ossidazione del acetamminofene rispetto all'elettrodo di platino (spostamento verso sinistra del picco anodico di quasi 100mV). Il picco anodico di tale analita risulta quindi, non solo molto ben definito e amplificato (vedi tabella 9), ma dal grafico risulta anche evidente che la reazione redox da irreversibile, quale è sull'elettrodo di Pt, diventa pressoché reversibile sull'elettrodo modificato dal PEDOT. Inoltre, sul PEDOT sintetizzato in liquido ionico, la cinetica di reazione è più lenta rispetto a quello che si verifica sul polimero sintetizzato in mezzo acquoso in quanto nella curva in blu del grafico si possono vedere due picchi parzialmente sovrapposti (0.42V e 0.45V vs Ag/AgCl) e relativi ai singoli elettroni ceduti nel processo ossidativo. Nel PEDOT-PSS, lo scambio di ogni elettrone è temporalmente coincidente per cui i due picchi sono perfettamente sovrapposti. Il rallentamento nella cinetica di ossidazione che si osserva per il

PEDOT-PYR<sub>14</sub>TFSI è probabilmente dovuto al fatto che gli ioni del liquido ionico persi durante la ciclazione nella stessa soluzione elettrolitica di tampone fosfato fanno perdere parzialmente il drogaggio del polimero. Infatti gli ioni Na<sup>+</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> potranno essere scambiati con quelli del liquido ionico PYR<sub>14</sub><sup>+</sup> e TFSI<sup>-</sup> ma a causa della scarsa mobilità di questi ultimi tale fenomeno avverrà fino ad un valore limite oltre il quale si avrà una parziale perdita della conducibilità del polimero per innalzamento del band gap energetico tra le bande di valenza e quelle di conduzione. Inoltre nel PEDOT-PYR<sub>14</sub>TFSI, le catene polimeriche non sono del tutto lineari (a causa del liquido ionico rimasto intrappolato al suo interno) e ciò fa perdere la coassialità degli orbitali di tipo p e quindi viene meno il carattere metallico del materiale per innalzamento del band-gap tra le bande di conduzione e quelle di valenza.

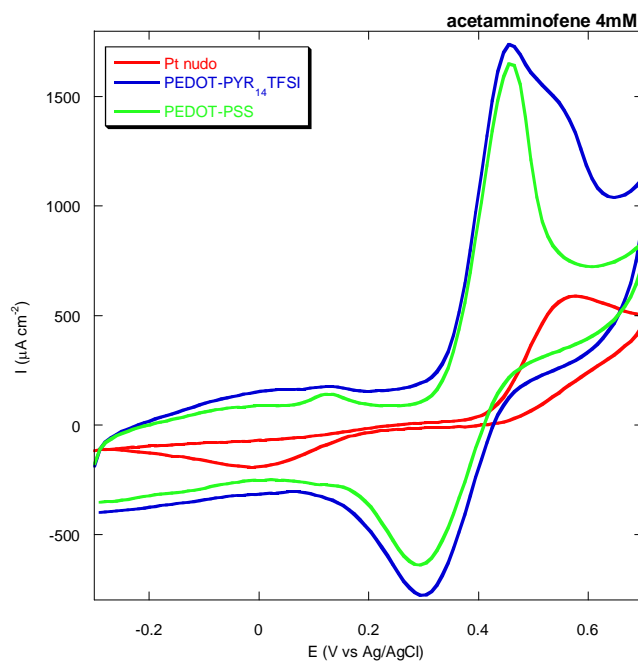
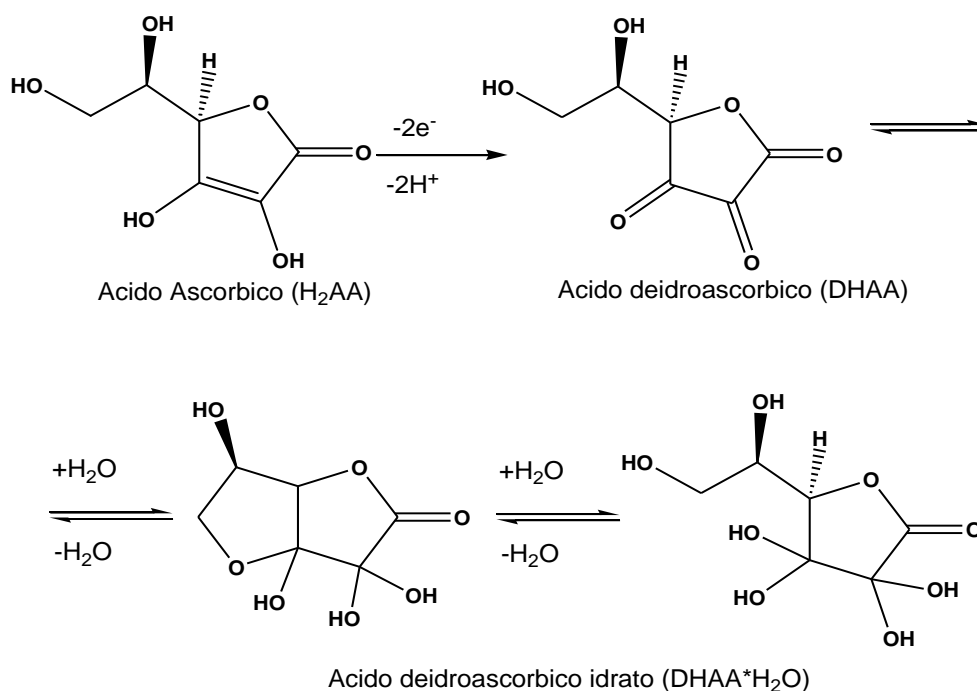


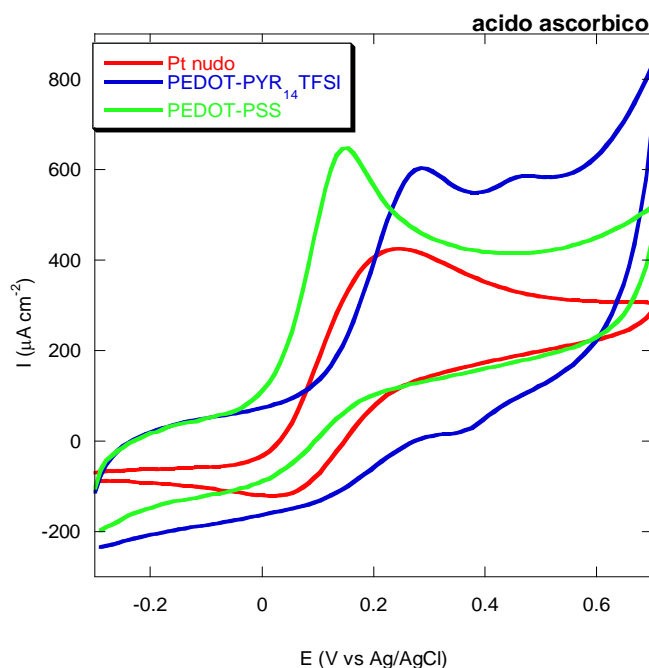
Figura 87 Voltammetria ciclica per una soluzione di acetamminofene 4mM. Range di potenziale  $-0.3V < E \text{ vs Ag|AgCl} < +0.7V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 2 cicli.

- L'elettroossidazione dell'**acido ascorbico** è stata ampiamente studiata da Rueda e collaboratori [201] i quali hanno valutato l'influenza del pH sull'ossidazione di questo analita su elettrodi d'oro. Mediante una tecnica cronoamperometrica, è stato stimato che il numero di elettroni che prende parte all'ossidazione è circa 1,9 per molecola [202] e sulla base di questa evidenza è stato proposto il seguente meccanismo di reazione.



**Figura 88 Schema di ossidoriduzione elettrochimica dell'acido ascorbico.**

La formazione della specie DHAA avviene attraverso la formazione di un intermedio radical anionico, l'acido monoidroascorbico o deidroascorbico, a partire dall'acido ascorbico H<sub>2</sub>AA. Il DHAA va incontro a una reazione di idratazione caratteristica del gruppo carbonilico per formare il prodotto DHAA·H<sub>2</sub>O, il quale è elettricamente inattivo. Di conseguenza, l'elettroossidazione del H<sub>2</sub>AA è irreversibile, come anche dimostrato dall'assenza dei picchi catodici nel grafico in figura 89. Anche per l'acido ascorbico, il processo ossidativo è cineticamente più lento sul polimero sintetizzato in liquido ionico, rispetto a quello ottenuto in ambiente acquoso. Infatti, nella curva in blu sono presenti due distinti picchi anodici (uno intorno a 0.23V e l'altro a 0.42V vs Ag/AgCl) relativi allo scambio dei singoli elettroni durante il processo redox. Nel PEDOT-PSS, questo stesso processo di ossidazione avviene con una cinetica molto più rapida e questo determina la totale sovrapposizione dei due picchi.



**Figura 89** Voltammetria ciclica per una soluzione di acido ascorbico 4mM. Range di potenziale  $-0.3V < E \text{ vs Ag|AgCl} < +0.7V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 2 cicli.

Appare evidente che il PEDOT cresciuto in PSS ha una migliore risposta elettrochimica nel confronti dell'acido ascorbico rispetto a quello cresciuto in  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$  in quanto, non solo amplifica meglio il segnale (vedi tabella 9) ma abbassa la sovratensione necessaria per la scarica redox (0.18V vs Ag/AgCl) sia rispetto al Pt nudo (0.22V vs Ag/AgCl) sia rispetto al Pt modificato con PEDOT- $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$  (0.30V vs Ag/AgCl).

- L'ossidazione elettrochimica dell'**acido caffeico** è stata studiata da molti autori [203-210] ed è stato dimostrato che avviene mediante il coinvolgimento di due elettroni per molecola con formazione dell'acido caffeico o-chinonico che decompone molto velocemente a pH superiori a 7.4 [207-211]. Lo schema di reazione è il seguente:

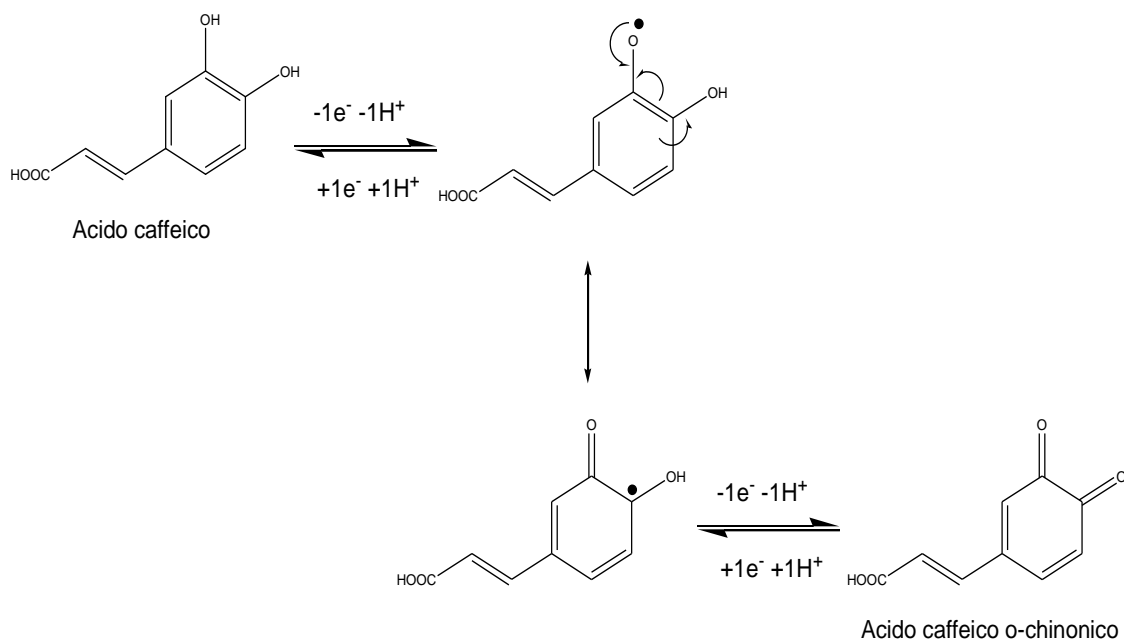


Figura 90 Schema di ossidoriduzione elettrochimica dell'acido caffeico.

La soluzione nella quale è solubilizzato l'acido caffeico è tamponata a pH 7.0 per cui il prodotto dell'elettroossidazione non subisce ulteriore decomposizione, come dimostra la buona reversibilità della curva di voltammetria ciclica di seguito riportata:

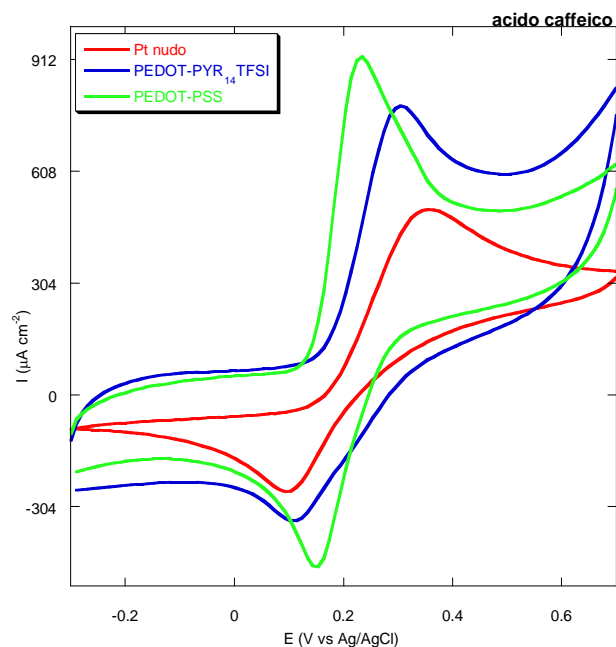
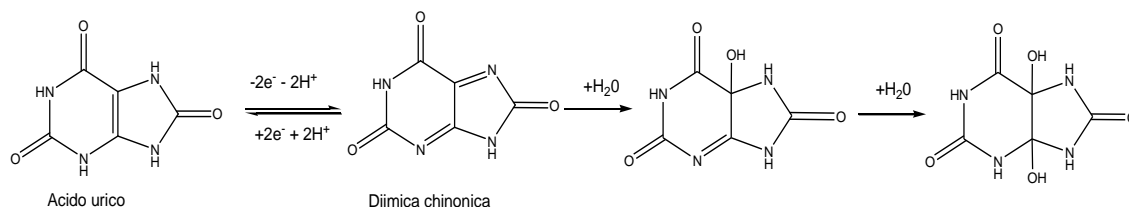


Figura 91 Voltammetria ciclica per una soluzione di acido caffeico 4mM. Range di potenziale  $-0.3V < E \text{ vs Ag|AgCl} < +0.7V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 2 cicli.



Infatti la presenza dei picchi sia anodici che catodici molto ravvicinati in termini di potenziale (in particolare per l'elettrodo modificato con PEDOT sintetizzato in PSS) confermano che la reazione redox è reversibile. Anche per questo analita, il PEDOT sintetizzato nella soluzione acquosa di PSS, mostra un segnale elettrochimico ben amplificato e spostato verso valori più negativi di circa 100mV. Per entrambi i polimeri, il processo redox che coinvolge gli elettroni è cineticamente veloce in quanto nel grafico in figura 91, tutte le curve mostrano un solo picco ossidativo. La reazione redox è meglio evidente sul materiale sintetizzato in PSS in quanto il picco, a parità di concentrazione, ha maggiore intensità e una minore sovratensione (0.21V vs Ag/AgCl) rispetto a quella riscontrata per il Pt modificato con PEDOT-PR<sub>14</sub>TFSI (0.30V vs Ag/AgCl) e per il Pt nudo (0.39V vs Ag/AgCl).

- L'ossidazione elettrochimica dell'**acido urico** è stata ampiamente studiata [211-213]. Le informazioni ottenute in questi studi indicano che la reazione di ossidazione dell'acido urico, sia quella enzimatica che quella elettrochimica, procede con lo stesso identico meccanismo [214] di seguito riportato:



**Figura 92 Schema di ossidoriduzione elettrochimica dell'acido urico.**

È noto che a pH 7.0 [215-217] l'acido urico perde  $2e^-$  e  $2H^+$  ad un valore di potenziale pari a circa +0.45 V vs Ag|AgCl così da portare alla formazione di un prodotto intermedio instabile per il quale è stata proposta una struttura chinoide-dimminica e che reagisce facilmente con l'acqua.

L'assenza del picco catodico nel seguente grafico dimostra l'irreversibilità della reazione redox. In questo caso il polimero cresciuto in liquido ionico mostra una miglior capacità nel catalizzare la reazione redox (data dalla maggiore intensità del picco anodico) ma il polimero cresciuto in soluzione acquosa di PSS abbassa notevolmente la sovratensione della scarica ossidativa rispetto all'elettrodo di Pt non

modificato (il picco infatti è spostato di quasi 200mV verso valori più negativi di potenziale).

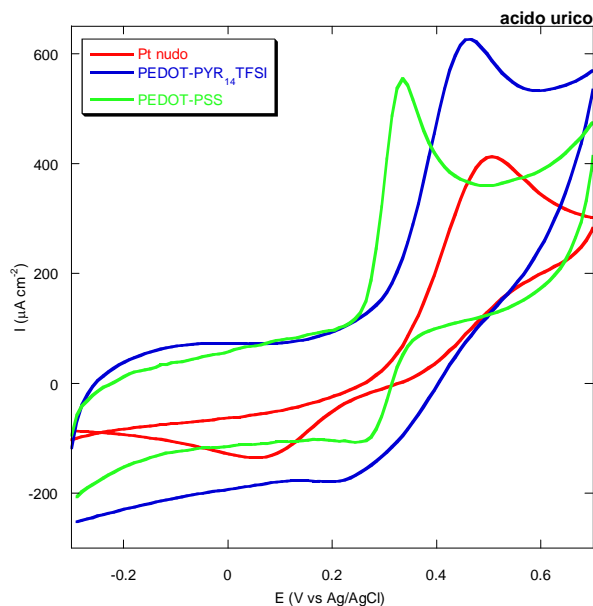


Figura 93 Voltammetria ciclica per una soluzione di acido urico 4mM. Range di potenziale  $-0.3V < E$  vs  $Ag|AgCl < +0.7V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 2 cicli.

- L'elettroossidazione del **catecolo** consiste nella sua ossidazione ad *o*-benzochinone, una specie che può essere nuovamente ridotta a catecolo. Si tratta quindi di un processo semireversibile a 2 elettroni, chiaramente influenzato dal pH del mezzo.

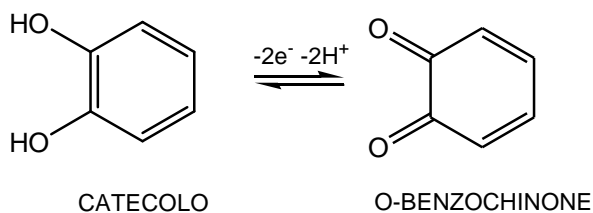
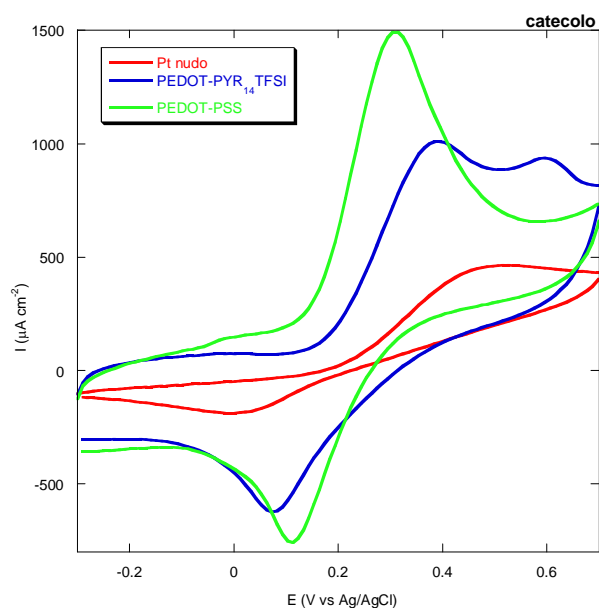


Figura 94 Schema di ossidoriduzione elettrochimica del catecolo

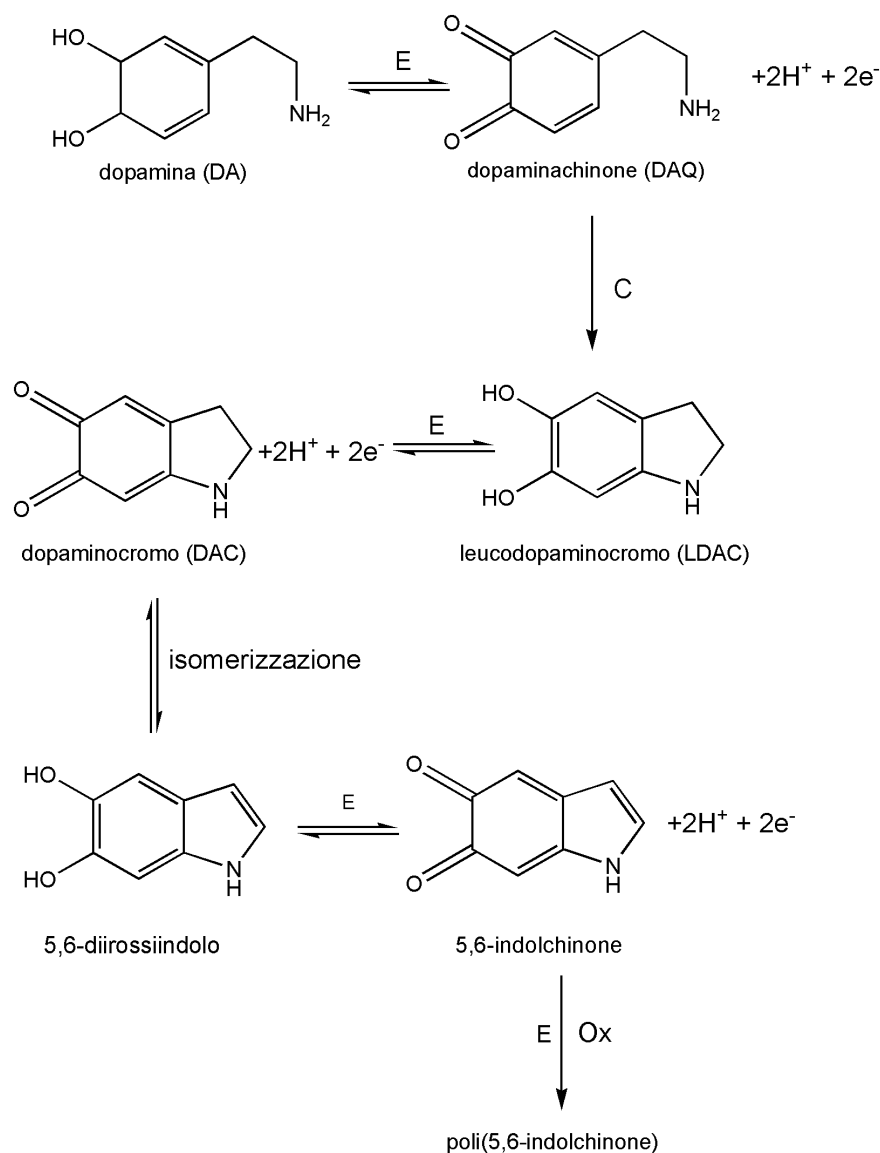
I voltammogrammi relativi ad una soluzione 4mM di catecolo, mostrano un picco anodico che rappresenta tale trasformazione del catecolo ad *o*-benzochinone [218,219]. Sul polimero sintetizzato in liquido ionico la cinetica dell'ossidazione del catecolo è più lenta e coinvolge un elettrone per volta come dimostra la curva in blu del grafico in figura 95 che presenta due picchi anodici (uno a 0.37V e uno 0.57V vs Ag/AgCl).



**Figura 95 Voltammetria ciclica per una soluzione di catecolo 4mM. Range di potenziale - 0.3V < E vs Ag|AgCl < +0.7V; velocità di scansione 20mV/s per 2 cicli.**

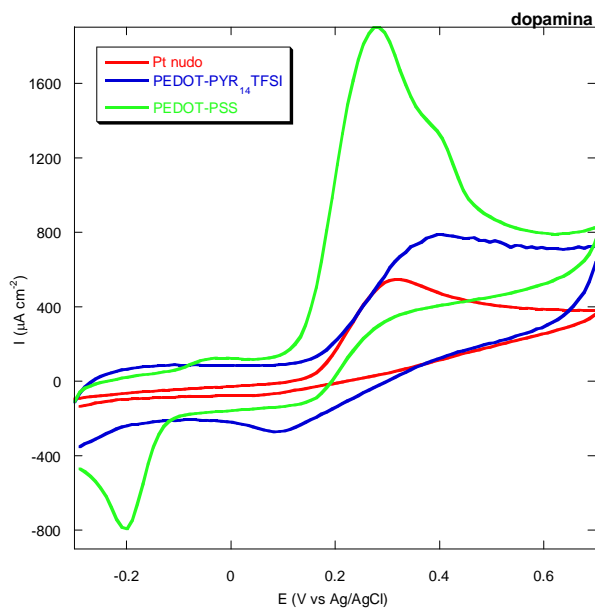
Il PEDOT esercita un'attività catalitica nei confronti della reazione di ossido-riduzione del catecolo e, anche in questo caso, il polimero cresciuto in soluzione acquosa di PSS dimostra di possedere proprietà catalitiche migliori in quanto amplifica meglio il segnale elettrochimico a parità di concentrazione e abbassa la sovratensione di scarica di tale analita (0.29V vs Ag/AgCl) rispetto sia al PEDOT-PYR<sub>14</sub>TFSI (0.38V vs Ag/AgCl) sia rispetto al Pt nudo (0.46V vs Ag/AgCl).

- Per la **dopamina** è stato proposto un percorso elettrochimico che avviene attraverso un meccanismo ECE (elettrochimico-chimico-elettrochimico) [220]. Essa viene dapprima ossidata a dopaminachinone (DAQ), quindi la ciclizzazione intramolecolare del DAQ, via addizione di Michael-1,4, porta alla formazione del leucodopaminocromo (LDAC), il quale è ossidato a dopaminocromo (DAC). Il DAC può subire ulteriormente reazioni di polimerizzazione sulla superficie dell'elettrodo, portando alla deposizione di un polimero melanino-simile, responsabile della graduale perdita di attività dell'elettrodo (fenomeno di fouling).



**Figura 96 Schema di ossidoriduzione elettrochimica della dopamina.**

Sono stati esaminati gli effetti del pH della soluzione sulla polimerizzazione: i risultati suggeriscono che la presenza di una concentrazione di  $\text{H}^+$  relativamente alta inibisce la ciclizzazione intramolecolare del DAQ. I picchi redox, inoltre, sono spostati verso potenziali più ossidativi con l'incremento del pH della soluzione [221].



**Figura 97** Voltammetria ciclica per una soluzione di dopamina 4mM. Range di potenziale  $-0.3V < E \text{ vs Ag|AgCl} < +0.7V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 2 cicli.

La voltammetria ciclica della dopamina mette ulteriormente in evidenza le migliori prestazioni del PEDOT cresciuto in soluzione acquosa di PSS in quanto si ha sia un notevole miglioramento dell'intensità del segnale elettrico (vedi tabella 9), a parità di concentrazione di analita, sia un abbassamento della sovratensione di scarica (0.24V vs Ag/AgCl) rispetto a quella registrata per l'elettrodo di Pt modificato con PEDOT-PYR<sub>14</sub>TFSI (0.37V vs Ag/AgCl). Inoltre sul PEDOT-PSS, probabilmente, risulta visibile anche la seconda reazione di ossidazione che dal leucodopaminocromo porta alla formazione del dopaminocromo, riscontrabile dalla presenza di un secondo picco a circa 0.38V vs Ag/AgCl.

- Numerosi studi sono stati effettuati sul meccanismo di ossidazione dell'**epinefrina** ad adrenocromo e questi hanno dimostrato che il meccanismo procede con la formazione di intermedi che derivano da una sequenziale perdita di un elettrone e un protone per volta [222] sebbene è possibile che possano esistere altri intermedi di reazione [223-228].

Lo schema di reazione riportato in figura 98 illustra il meccanismo di reazione nel quale l'epinefrina si ossida per formare l'*o*-semichinone radicalico [229,230].

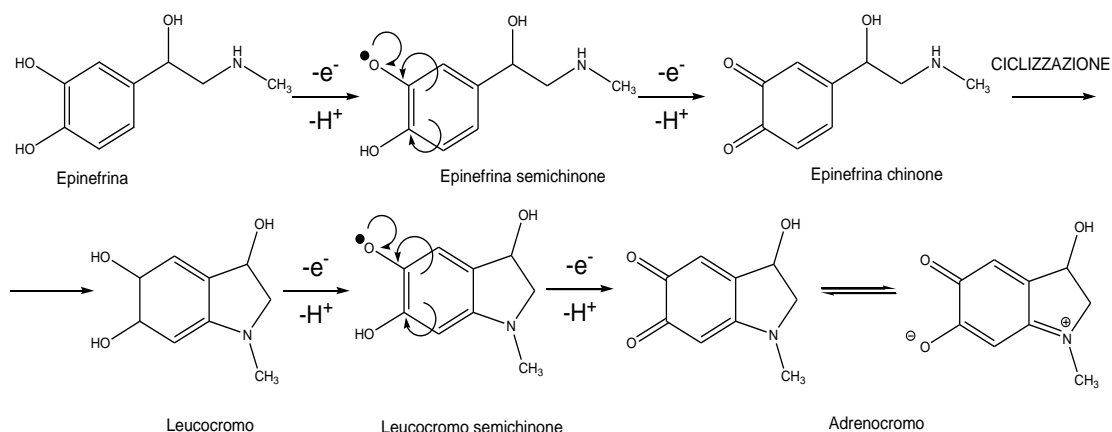


Figura 98 Schema di ossidoriduzione elettrochimica dell'epinefrina.

Il processo ossidativo a carico dell'epinefrina non viene particolarmente amplificato, nel caso del polimero cresciuto in ambiente acquoso, questo probabilmente è da imputare al fatto che tale analita ha una elevata facilità a ossidarsi (anche in una regione di potenziale non a ridosso del picco) con formazione di tutta una serie di prodotti secondari di reazione che possono disturbare (ad esempio, per adsorbimento irreversibile) l'interfase elettrochimica con conseguente interferenza del segnale in corrente.

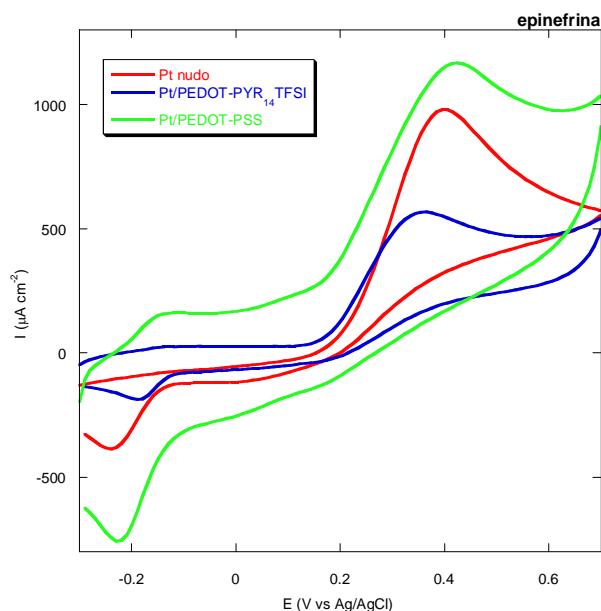


Figura 99 Voltammetria ciclica per una soluzione di epinefrina 4mM. Range di potenziale  $-0.3V < E$  vs  $Ag|AgCl < +0.7V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 2 cicli.

Questo è dimostrato dal fatto che si ottengono per tutti e tre gli elettrodi (Pt nudo, Pt modificato con PEDOT-PSS e con PEDOT-PYR<sub>14</sub>TFSI) picchi poco definiti e nella stessa regione di potenziale (+0.4V vs Ag|AgCl).

- L'ossidazione della **serotonina** consiste in una elettrodimerizzazione come di seguito illustrato nello schema:

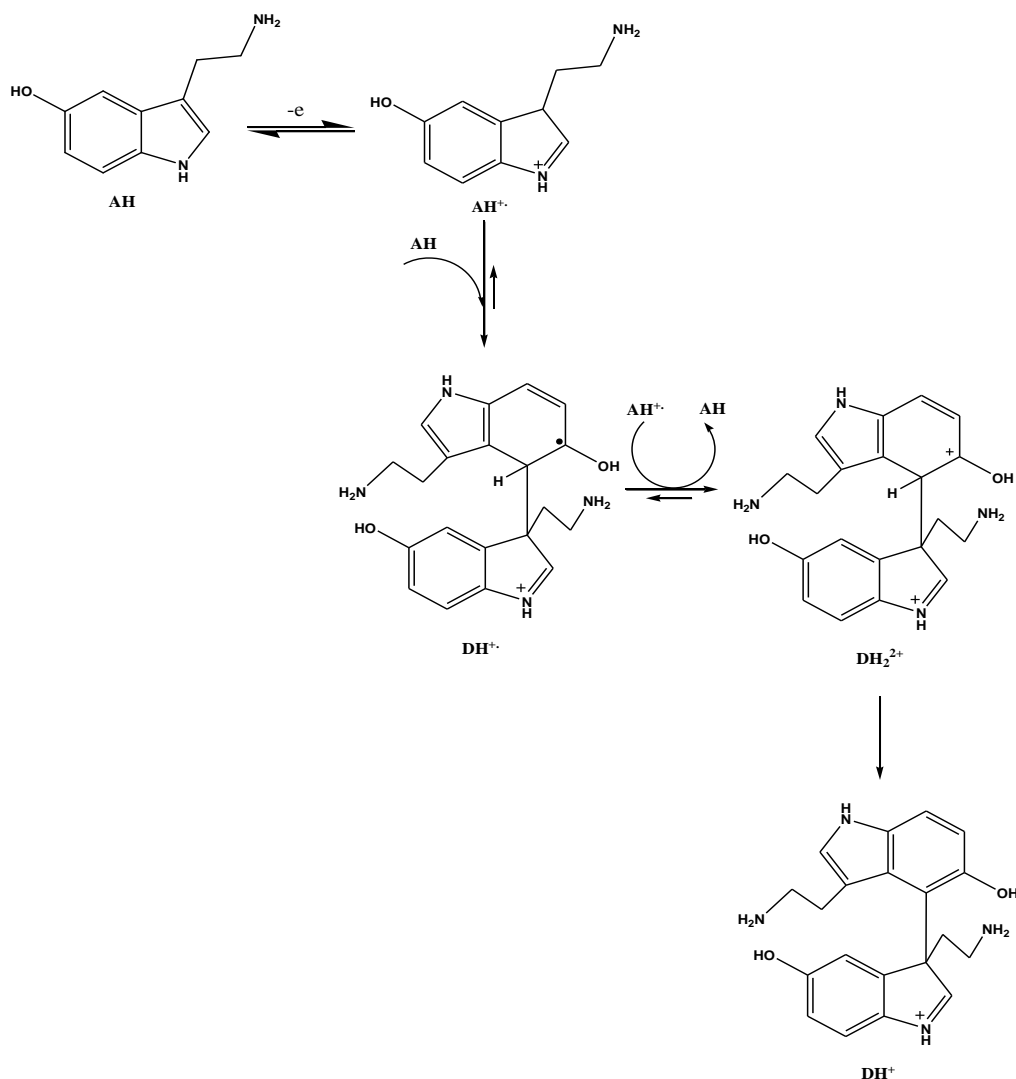


Figura 100 Schema di ossidoriduzione elettrochimica della serotonina.

L'intero processo può essere così rappresentato:  $2\text{AH} \rightarrow \text{DH}^+ + 2e^- + \text{H}^+$  dove AH rappresenta la forma molecolare in cui l'analita predomina in mezzi acidi e DH<sup>+</sup> la specie dimerica.

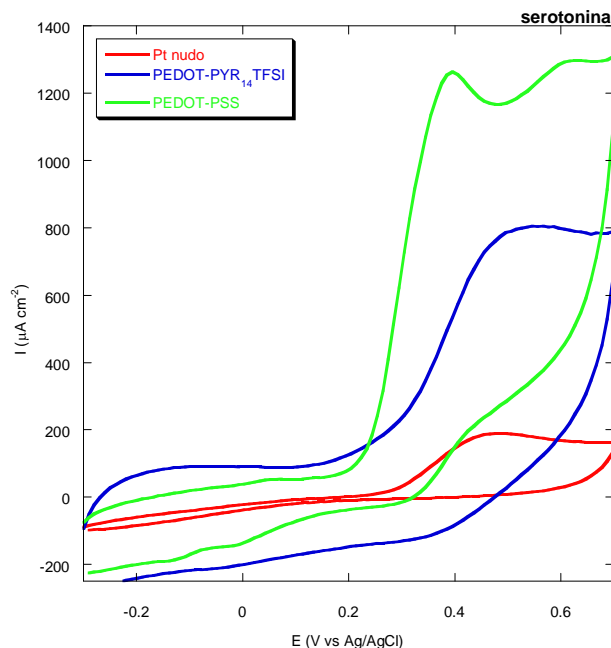
La produzione della specie radicalica è dovuta all'estrazione di un elettrone dalla specie molecolare, processo che avviene all'interfaccia elettrodo/soluzione.

Successivamente hanno luogo delle reazioni chimiche in cui sono velocemente formate e distrutte specie intermedie [231].

In mezzi tamponati, l'ossidazione della serotonina ad un elettrodo appare come una singola onda di ossidazione. Wrona e collaboratori hanno ipotizzato che tale processo comporti la rimozione di  $2e^-$  e di  $2H^+$  contemporaneamente. Le specie intermedie prodotte, dopo questo iniziale step, possono reagire ulteriormente per produrre molti altri prodotti redox attivi, dando luogo ad una seconda, piccola onda di ossidazione, osservata a potenziali più alti [232]. Questa seconda onda ossidativa è ben visibile nel grafico in figura 101 dove si ha un picco ben evidente a 0.6V vs Ag/AgCl per il PEDOT cresciuto in ambiente acquoso.

L'ossidazione elettrochimica della serotonina rimane oggetto di numerosi studi. Essa comporta l'adsorbimento di numerosi reagenti e prodotti all'elettrodo, cosa che rende difficile giungere a deduzioni meccanicistiche conclusive sulla base di studi elettroanalitici [233].

La voltammetria ciclica di seguito riportata mostra il comportamento dei due polimeri nei confronti della serotonina:



**Figura 101** Voltammetria ciclica per una soluzione di serotonina 4mM. Range di potenziale  $-0.3V < E$  vs Ag|AgCl  $< +0.7V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 2 cicli.

Anche in questo caso il polimero cresciuto in ambiente acquoso mostra una migliore attività catalitica rispetto alla reazione di ossidoriduzione della serotonina.



**Tabella 9** Determinazione dell'amplificazione del segnale elettrochimico relativo alla reazione redox di ogni analita studiato.

Analita	Elettrodo	$i_{pa}$ ( $\mu A\ cm^{-2}$ )	Amplificazione del segnale A(%)
<b>Acetamminofene</b>	Pt nudo	594	
	Pt/PEDOT-PYR <sub>14</sub> TFSI	1740	192
	Pt/PEDOT-PSS	1645	177
<b>Ac. Ascorbico</b>	Pt nudo	430	
	Pt/PEDOT-PYR <sub>14</sub> TFSI	603	40
	Pt/PEDOT-PSS	649	51
<b>Ac. Caffeico</b>	Pt nudo	506	
	Pt/PEDOT-PYR <sub>14</sub> TFSI	786	55
	Pt/PEDOT-PSS	916	81
<b>Ac. Urico</b>	Pt nudo	413	
	Pt/PEDOT-PYR <sub>14</sub> TFSI	627	52
	Pt/PEDOT-PSS	554	34
<b>Catecolo</b>	Pt nudo	457	
	Pt/PEDOT-PYR <sub>14</sub> TFSI	1008	120
	Pt/PEDOT-PSS	1505	228
<b>Dopamina</b>	Pt nudo	539	
	Pt/PEDOT-PYR <sub>14</sub> TFSI	782	45
	Pt/PEDOT-PSS	1893	251
<b>Epinefrina</b>	Pt nudo	974	
	Pt/PEDOT-PYR <sub>14</sub> TFSI	565	-42
	Pt/PEDOT-PSS	1176	21
<b>Serotonina</b>	Pt nudo	193	
	Pt/PEDOT-PYR <sub>14</sub> TFSI	804	316
	Pt/PEDOT-PSS	1262	554

L'amplificazione del segnale A(%) è stata determinata come segue:

$$A(\%) = \frac{i_{p\text{ptmodifica}} - i_{p\text{ptnudo}}}{i_{p\text{ptnudo}}} \cdot 100$$

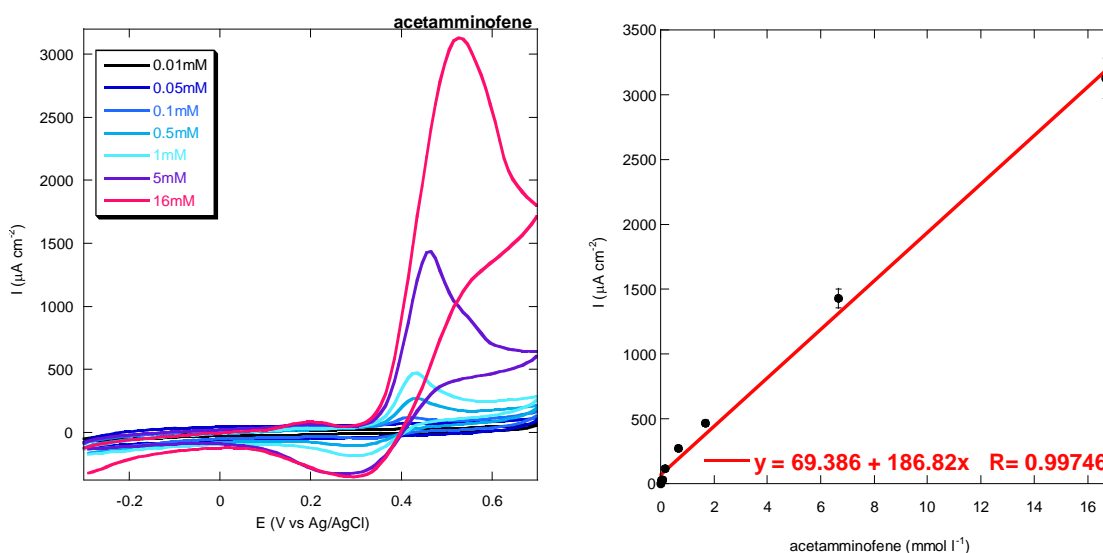
Nel complesso il PEDOT-PSS ha dimostrato di essere un materiale migliore per la determinazione di analiti di interesse biologico (come dimostrato in tabella 9) in

quanto, grazie alle sue bande bipolaroniche, è in grado di abbassare la sovratensione e quindi di facilitare la scarica ossidativa, scopo del lavoro di questa tesi, rispetto al polimero sintetizzato in liquido ionico poiché gli ioni di grandi dimensioni di cui quest'ultimo è costituito, rimangono bloccati nella matrice polimerica. Questa condizione altera la linearità delle catene e interrompe la sovrapposizione degli orbitali di conduzione e di valenza al punto da diminuire le sue proprietà di conduttore. Inoltre la presenza degli ioni fortemente idrofobici quali sono il pirrolidinio e la sulfonilimide, nella matrice polimerica, non aiutano la diffusione delle soluzioni acquose degli analiti biologici all'interno della matrice stessa.

Pertanto per il lavoro di questa tesi è stato effettuato lo studio della risposta del PEDOT-PSS a concentrazioni crescenti dei diversi analiti fino ad ora elencati.

Di seguito si riportano tutte le analisi di voltammetria ciclica registrate per ogni analita con le rispettive rette di taratura estrapolate graficando il valore della densità di corrente in funzione della concentrazione di analita.

- La determinazione analitica dell'**acetamminofene**, importante in campo clinico e farmaceutico, ha dato un buon risultato nel range di concentrazione compreso tra 0.01mM e 16mM.

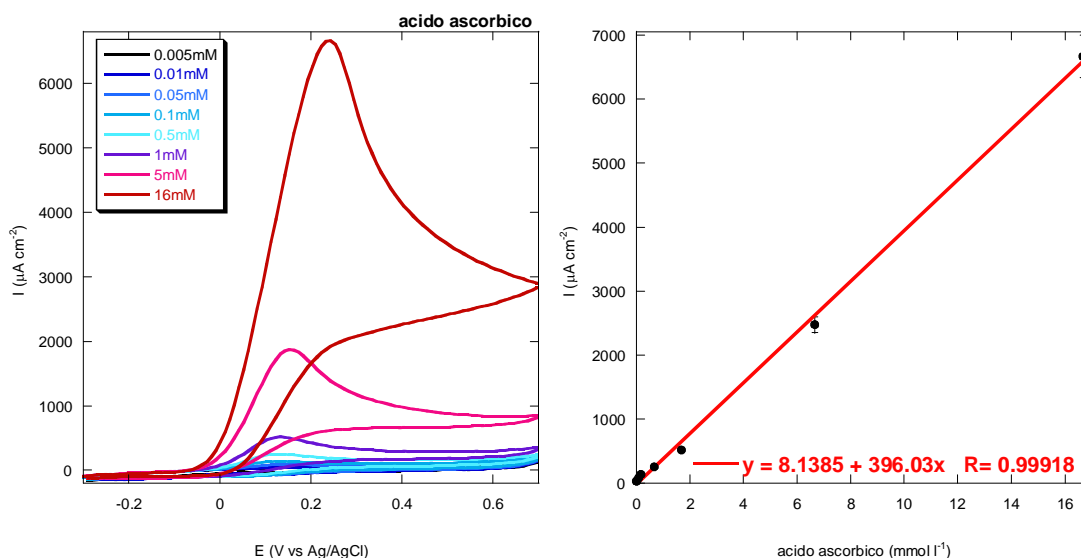


**Figura 102** Voltammetria ciclica per soluzioni di acetamminofene a concentrazioni crescenti e relativa retta di taratura. Range di potenziale  $-0.3V < E \text{ vs Ag|AgCl} < +0.7V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 1 ciclo. Intervallo di concentrazione studiato 0.01mM-16mM.

Da notare lo spostamento del picco anodico verso potenziali più positivi mano a mano che aumenta la concentrazione dell'acetamminofene. Questo fenomeno può

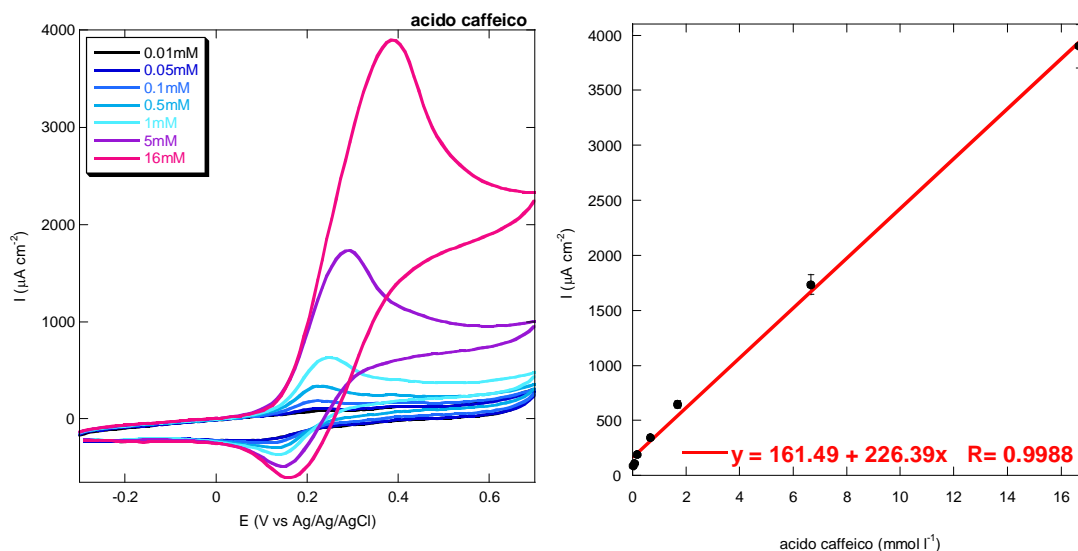
essere spiegato considerando la formazione irreversibile di specie secondarie (soprattutto con l'aumentare della concentrazione di analita), come precedentemente illustrato in figura 86 nello schema di ossidoriduzione di tale analita, e confermato dall'irreversibilità della reazione redox per l'assenza dei picchi catodici.

- La titolazione elettrochimica dell'**acido ascorbico** ha dato un buon risultato nel range di concentrazione da noi studiato e utile per determinazioni in campo alimentare, come ad esempio in bevande come i succhi di frutta nei quali questa molecola viene aggiunta come conservante e antiossidante. La retta di taratura ottenuta mostra una buona linearità nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0.005mM e 16mM.



**Figura 103** Voltammetria ciclica per soluzioni di acido ascorbico a concentrazioni crescenti e relativa retta di taratura. Range di potenziale  $-0.3V < E \text{ vs Ag|AgCl} < +0.7V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 1 ciclo. Intervallo di concentrazione studiato 0.005mM-16mM.

- Per quanto riguarda la determinazione analitica dell'**acido caffeico**, il dispositivo sensoristico risponde bene nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0.01mM e 16mM.



**Figura 104** Voltammetria ciclica per aggiunte di acido caffeico a concentrazioni crescenti e relativa retta di taratura. Range di potenziale  $-0.3V < E \text{ vs } Ag|AgCl < +0.7V$ ; velocità di scansione  $20\text{mV/s}$  per 1 ciclo. Intervallo di concentrazione studiato  $0.01\text{mM}$ - $16\text{mM}$ .

Anche per questo analita si osserva uno spostamento della posizione del picco anodico verso potenziali redox più positivi, sempre imputabile alla formazione di prodotti secondari, come catene di diversa lunghezza di acido policafeico, durante il processo redox di tale analita.

- Per l'**acido urico**, il range di concentrazione nel quale si ha l'intervallo di linearità della retta di taratura è compreso tra  $0.01\text{mM}$  e  $16\text{mM}$ . In questo caso, però, la posizione del picco anodico rimane costante all'aumentare della concentrazione.

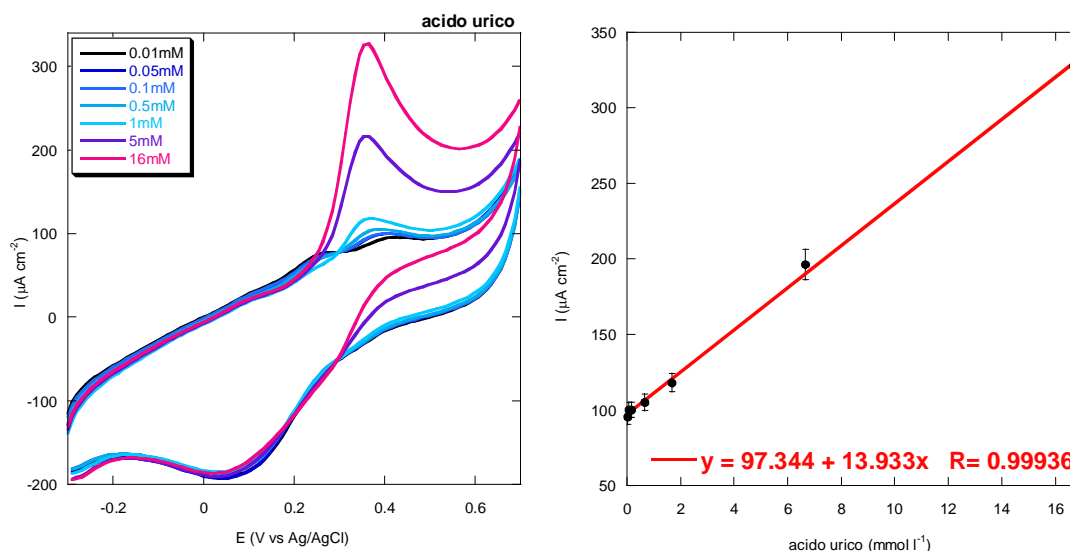


Figura 105 Voltammetria ciclica per soluzioni di acido urico a concentrazioni crescenti e relativa retta di taratura. Range di potenziale  $-0.3\text{V} < E \text{ vs Ag|AgCl} < +0.7\text{V}$ ; velocità di scansione  $20\text{mV/s}$  per 1 ciclo. Intervallo di concentrazione studiato  $0.01\text{mM}$ - $16\text{mM}$ .

- Anche per il **catecolo**, con il procedere delle aggiunte di tale analita, si osserva uno spostamento della posizione del picco anodico verso potenziali più positivi e l'intervallo di linearità è compreso nel range di concentrazioni tra  $0.01\text{mM}$  e  $16\text{mM}$ . Questo è utile per determinazioni analitiche sia in campo alimentare (ad esempio nel vino) che in quello clinico (ad esempio nel liquor cerebro-spinale).

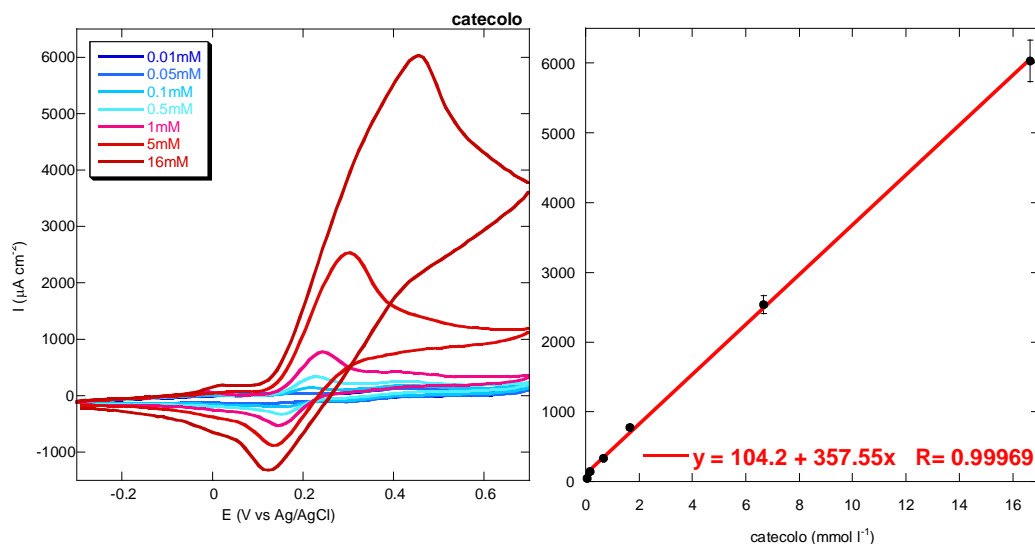


Figura 106 Voltammetria ciclica per soluzioni di catecolo a concentrazioni crescenti e relativa retta di taratura. Range di potenziale  $-0.3\text{V} < E \text{ vs Ag|AgCl} < +0.7\text{V}$ ; velocità di scansione  $20\text{mV/s}$  per 1 ciclo. Intervallo di concentrazione studiato  $0.01\text{mM}$ - $16\text{mM}$ .

- Nella determinazione della **dopamina**, il grafico di voltammetria ciclica mostra delle curve i cui picchi anodici mantengono sempre la stessa posizione. La retta di taratura, estrapolata dai valori in corrente in corrispondenza di tali picchi, dimostra che in tutto il range di concentrazioni testate (0.01mM-16mM), il sistema risponde linearmente.

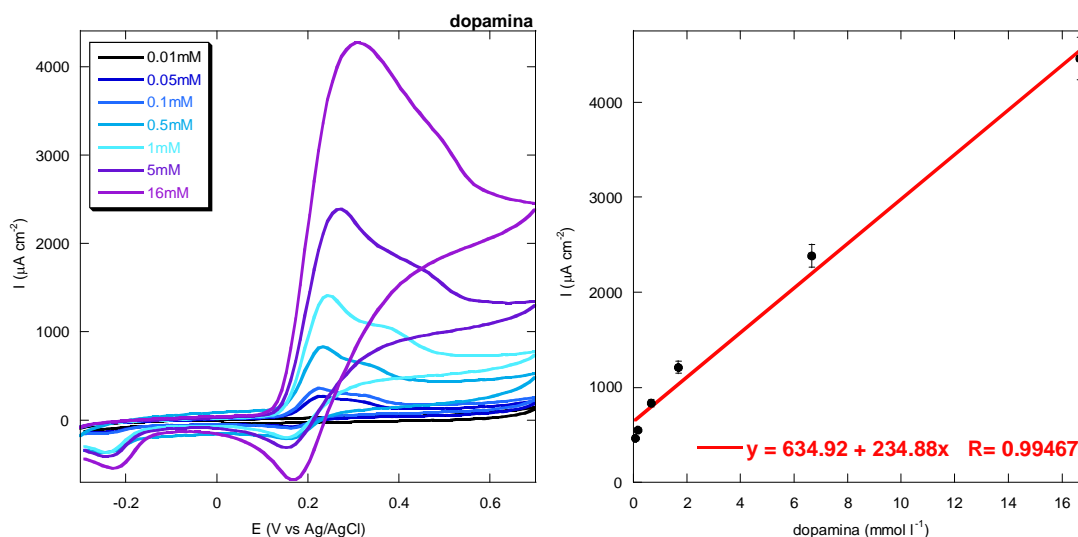


Figura 107 Voltammetria ciclica per soluzioni di dopamina a concentrazioni crescenti e relativa retta di taratura. Range di potenziale  $-0.3V < E \text{ vs Ag|AgCl} < +0.7V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 1 ciclo. Intervallo di concentrazione studiato 0.01mM-16mM.

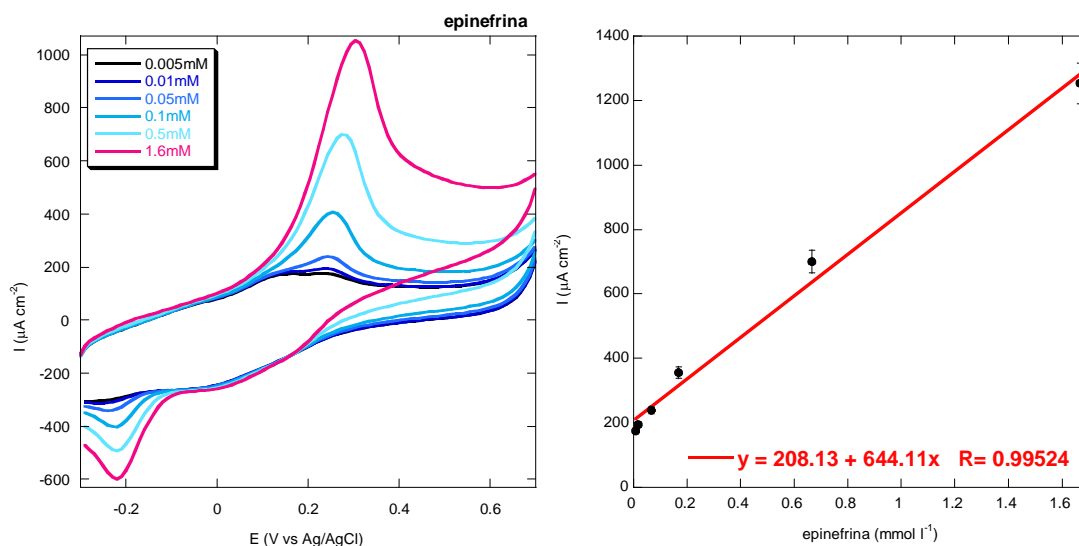


Figura 108 Voltammetria ciclica per soluzioni di epinefrina a concentrazioni crescenti e relativa retta di taratura. Range di potenziale  $-0.3V < E \text{ vs Ag|AgCl} < +0.7V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 1 ciclo. Intervallo di concentrazione 0.005mM-2mM.

- Il dosaggio elettrochimico dell'**epinefrina** per mezzo del sistema Pt|PEDOT-PSS mostra un intervallo di linearità abbastanza ristretto (0.005mM-1.6mM) e più basso rispetto a quello degli altri analiti. Ciò rende interessante questo dispositivo per la reale applicazione in campo clinico e diagnostico sia per la dopamina che per l'epinefrina.

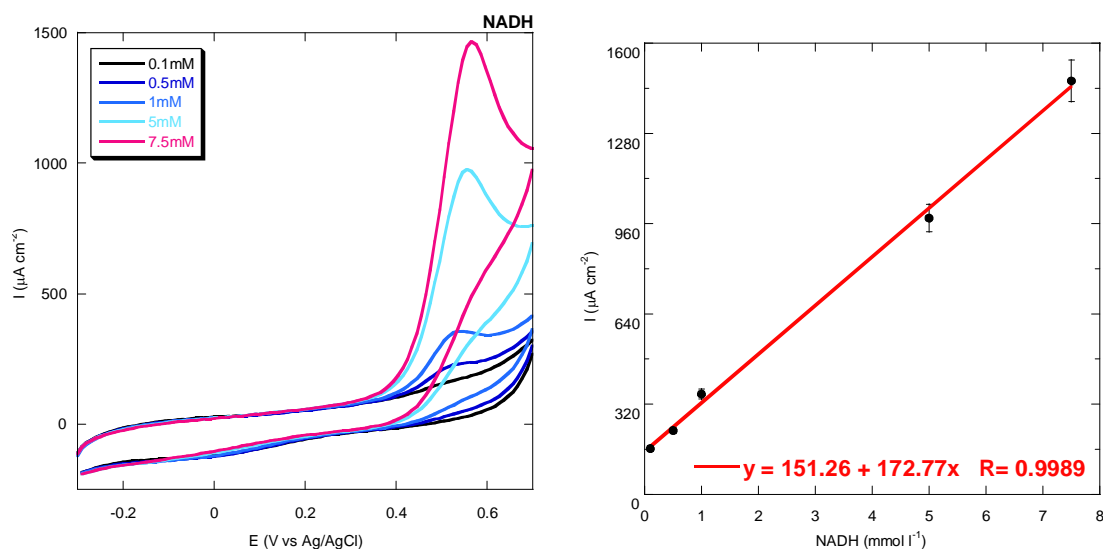
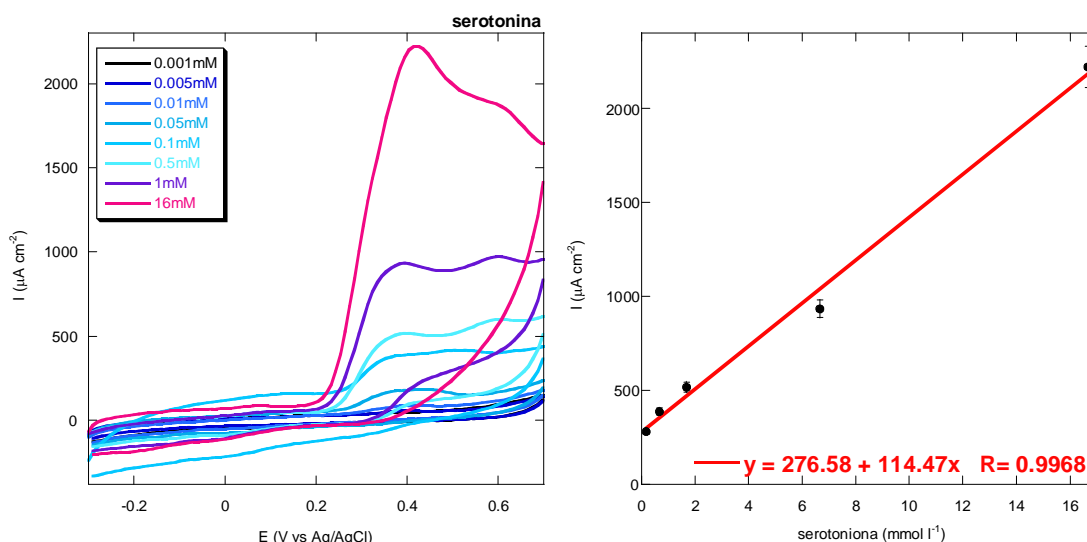


Figura 109 Voltammetria ciclica per soluzioni di NADH a concentrazioni crescenti e relativa retta di taratura. Range di potenziale  $-0.3V < E \text{ vs Ag|AgCl} < +0.7V$ ; velocità di scansione 20mV/s per 1 cicli. Intervallo di concentrazione studiato 0.1mM-7.5mM.

- La titolazione del **NADH** per mezzo della voltammetria ciclica, consente solo di ottenere informazioni qualitative sulla concentrazione minima e massima utilizzabile di tale cofattore per l'eventuale utilizzo in coppia con enzimi riduttasi (al posto delle ossidasi) sempre per scopi analitici. In questo caso, il range di concentrazioni di NADH, al quale si osserva un'attività elettrochimica su PEDOT, è compreso tra 1 e 10mM.
- La titolazione elettrochimica della **serotonina**, importante in campo clinico, ha portato ad ottenere una retta di taratura con un range di linearità compreso tra 0.001mM e circa 16mM.



**Figura 110** Voltammetria ciclica per soluzioni di serotonina a concentrazioni crescenti e relativa retta di taratura. Range di potenziale  $-0.3\text{V} < E \text{ vs Ag|AgCl} < +0.7\text{V}$ ; velocità di scansione  $20\text{mV/s}$  per 1 ciclo. Intervallo di concentrazione  $0.001\text{mM}$ - $10\text{mM}$ .

Per quanto riguarda la determinazione di dopamina, epinefrina e serotonina, il PEDOT permette determinazioni preliminari su matrici sintetiche. Purtroppo per poter effettuare determinazioni su campioni reali sarebbe necessaria una opportuna separazione dei tre composti (contemporaneamente presenti nei fluidi biologici), ad esempio accoppiando la tecnica elettrochimica con una cromatografica. Questo si rende necessario in quanto la posizione dei picchi anodici dei tre analiti è molto prossima tra di loro per cui la loro contemporanea presenza porterebbe a una sovrastima o sottostima quantitativa.

L'utilità del PEDOT-PSS per la determinazione analitica delle molecole biologiche fino ad ora elencate può essere sintetizzata in un'unica tabella di seguito riportata.



**Tabella 10** Tabella riassuntiva dei dettagli dei metodi di determinazione per i singoli analiti e loro utilità nei diversi settori.

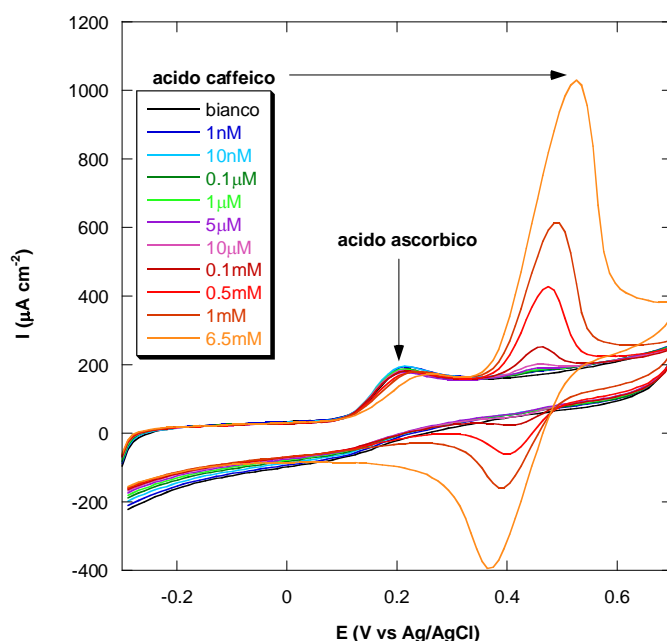
Analita	Range di linearità	LOD (mmol/l)	LOQ (mmol /l)	RSD (%)	Sensibilità $\mu\text{A l/cm}^2 \text{mmol}$	Durata	Equazione
Acetamminofene	0.01 – 16mmol/l	0.005	0.01	5	187	100''	$y=187x+69$
Utilità	Dosaggio del farmaco <i>in vivo</i> nei fluidi come saliva, sangue intero, plasma e urine						
Ac. Ascorbico	0.005 – 16mmol/l	0.001	0.005	5	396	100''	$y=396x-8$
Utilità	Dosaggio in bevande come succhi di frutta, mosto d'uva e vino per la determinazione del potere antiossidante						
Ac. Caffeico	0.01 – 16mmol/l	0.005	0.01	5	226	100''	$y=226x+161$
Utilità	Dosaggio in bevande come succhi di frutta, mosto d'uva e vino per la determinazione del potere antiossidante						
Ac. Urico	0.01 – 16mmol/l	0.005	0.01	5	14	100''	$y=14x+97$
Utilità	Dosaggio nei fluidi biologici come urine e plasma perché è coinvolto nella patogenesi della calcolosi renale e nella gotta						
Catecolo	0.01 – 16mmol/l	0.005	0.01	5	357	100''	$y=357x+104$
Utilità	Dosaggio <i>in vivo</i> nei fluidi biologici in quanto è il precursore dei neurotrasmettitori come epinefrina e norepinefrina coinvolti in numerose patologie come cardiopatie, neuropatie e disturbi renali.						
Dopamina	0.01 – 16mmol/l	0.005	0.01	5	235	100''	$y=235x+634$
Utilità	Dosaggio <i>in vivo</i> nei fluidi cerebrali in quanto una diminuzione di concentrazione è coinvolta nella patogenesi del morbo di Parkinson						
Epinefrina	0.005 – 1.6mmol/l	0.001	0.005	5	644	100''	$y=644x+208$
Utilità	Dosaggio <i>in vivo</i> nei fluidi cerebrali in quanto una diminuzione di concentrazione è coinvolta nella patogenesi della schizofrenia, depressione, stati di ansia e morbo di Alzheimer						
NADH	0.1 – 7.5mmol/l	0.05	0.1	5	173	100''	$y=173x+152$
Utilità	Dosaggio del cofattore in integratori utili in associazione alla terapia farmacologica per il trattamento di innumerevoli patologie come il morbo Alzheimer, stanchezza cronica, depressione, sclerosi multipla e il morbo di Parkinson						
Serotonina	0.2 – 16mmol/l	0.001	0.005	5	114	100''	$y=114x+276$
Utilità	Dosaggio <i>in vivo</i> nei fluidi cerebrali in quanto una diminuzione di concentrazione è coinvolta nella patogenesi della depressione e nei disturbi bipolari						

### 8.6.1 Determinazione analitica dell'acido caffeico nel vino

Alla luce dei risultati ottenuti con l'acido caffeico, il PEDOT cresciuto in ambiente acquoso risulta idoneo allo sviluppo di un dispositivo analitico per la determinazione di tale molecola nel vino. Infatti questa bevanda, e in particolare il vino rosso, è ricca di polifenoli come i flavanoli (catechina e epicatechina), i flavonoli (quercitina, rutina e nirutina), le antocianine (la cui più abbondante è la malvidina-3-O-glucoside), le protoantocianidine oligomeriche e polimeriche, i polifenoli acidi (tra cui l'acido gallico, l'acido caffeico, l'acido ferulico e l'acido p-cumarico), gli stilbeni (tra cui il resveratrolo) e molti altri polifenoli. Molti di questi composti hanno una documentata attività cardioprotettiva, antiinfiammatoria, anticarcinogenica, antivirale e antibatterica [234,235]. Studi epidemiologici hanno dimostrato che un consumo regolare e moderato di vino rosso riduce l'incidenza di molte malattie come l'infarto, l'aterosclerosi, il cancro ed altre [236,237] perciò la determinazione della composizione chimica, del contenuto in polifenoli e del potere antiossidante del vino risulta utile all'interpretazione degli studi epidemiologici. A tal fine sono stati utilizzati molti metodi, come la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), l'elettroforesi capillare in combinazione con diversi metodi di rilevazione quali l'UV-vis, la spettroscopia di massa e l'elettrochimica. Quest'ultima, negli ultimi anni, sta dando buoni risultati in quanto tutte le molecole polifenoliche presenti nel vino sono elettroattive. La prima tecnica elettrochimica utilizzata è stata la voltammetria ciclica per la determinazione del contenuto totale di polifenoli nel vino [238-241]. Anche la voltammetria differenziale ad impulsi è stata utilizzata per la determinazione analitica dei polifenoli negli alimenti soprattutto per la determinazione in tracce grazie alla maggiore sensibilità del metodo [242].

Per poter sviluppare e validare il metodo elettroanalitico, si è proceduto alla caratterizzazione del materiale mediante voltammetria ciclica e voltammetria differenziale ad impulsi per valutare il range di linearità, la sensibilità, il limite di rilevabilità, il limite quantificabile e la riproducibilità del sistema, anche in presenza di altre sostanze che non devono interferire con la determinazione dell'analita di interesse. Per tale motivo si è proceduto con la preparazione di un modello di vino costituito da acido tartarico 0.033M in una soluzione al 12% v/v di etanolo e acqua

distillata, tamponando tutto a pH 3.5 mediante NaOH [239]. Diversamente dalle analisi effettuate per l'acido caffeico in tampone fosfato a pH 7.0, quelle effettuate nel vino modello consentono di innalzare la sovratensione della scarica ossidativa dell'analita in modo da ottenere una migliore separazione del picco da quelli di altre sostanze contemporaneamente presenti nei campioni reali come, ad esempio, l'acido ascorbico. Di seguito si riporta la voltammetria ciclica effettuata su una soluzione di vino modello a pH 3.5, nella quale si ha una quantità crescente di acido caffeico e una quantità fissa di acido ascorbico (0.5mM).

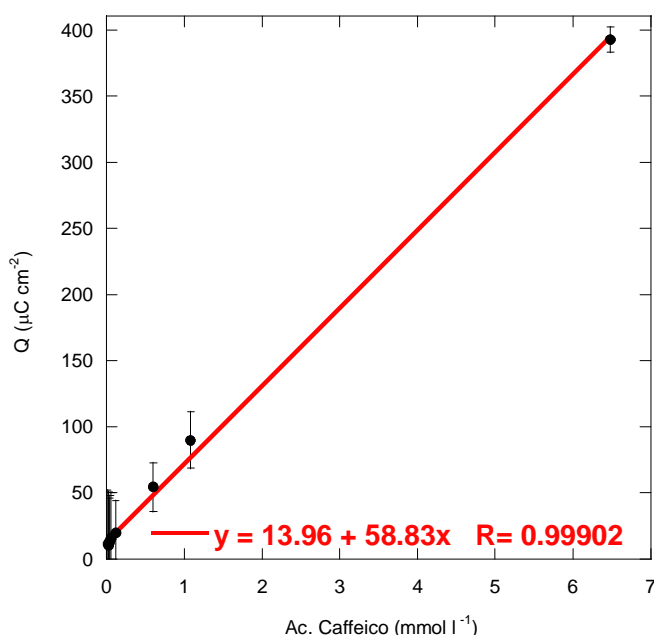


**Figura 111** Voltammetria ciclica in soluzione di vino modello effettuata lasciando costante la concentrazione di acido ascorbico 0.5mM e aumentando quella di acido caffeico. Potenziale compreso tra  $-0.3V < E \text{ vs Ag/AgCl} < +0.7V$ , velocità di scansione di 20mV/s per 1 ciclo per ogni valore di concentrazione di acido caffeico.

Dal grafico si vede chiaramente come il picco dell'acido ascorbico (0.20V vs Ag/AgCl) rimane costante mentre quello dell'acido caffeico aumenta linearmente all'aumentare della concentrazione secondo la retta più avanti riportata. Quindi la presenza dell'acido ascorbico non influenza la determinazione dell'acido caffeico in quanto i due picchi sono ben distinti e separati.

Si è preferito riportare la retta di taratura in funzione dell'area del picco anodico (associata alla quantità di carica scambiata durante il processo ossidativo) per ovviare alle limitazioni alle basse concentrazioni ( $10\text{nmol l}^{-1}$ - $1\mu\text{mol l}^{-1}$ ) incontrate nel valutare

l'intensità di corrente di picco. Di seguito si riporta la retta di taratura così ottenuta con relativo calcolo dell'errore:



**Figura 112** Retta di taratura dell'acido caffeico per concentrazioni comprese tra 10nmol l<sup>-1</sup> e 7mmol l<sup>-1</sup>. Sul grafico vengono riportati anche gli errori sulle singole misure per le differenti concentrazioni.

Dal grafico si vede come il sistema risponde linearmente su tutto l'intervallo di concentrazione testato (10nmol/l – 7mmol/l). La deviazione standard è stata calcolata per 5 campioni di PEDOT sintetizzati e testati nelle medesime condizioni sperimentali. Mediante analisi con voltammetria ciclica è stato valutato anche il limite di determinazione (LOD), cioè il valore di concentrazione corrispondente al segnale più basso misurabile sul campione con la certezza che questo segnale non venga scambiato per il segnale del bianco dovuto al rumore di fondo; secondo la statistica questo viene definito:

**LOD = valore medio dei bianchi + 3 volte la deviazione standard dei bianchi.**

Il limite di quantificazione (LOQ), invece, è il valore di concentrazione corrispondente al segnale misurabile sul campione a partire dal quale si può ragionevolmente cominciare a quantificare la concentrazione del campione stesso; generalmente è così definito:

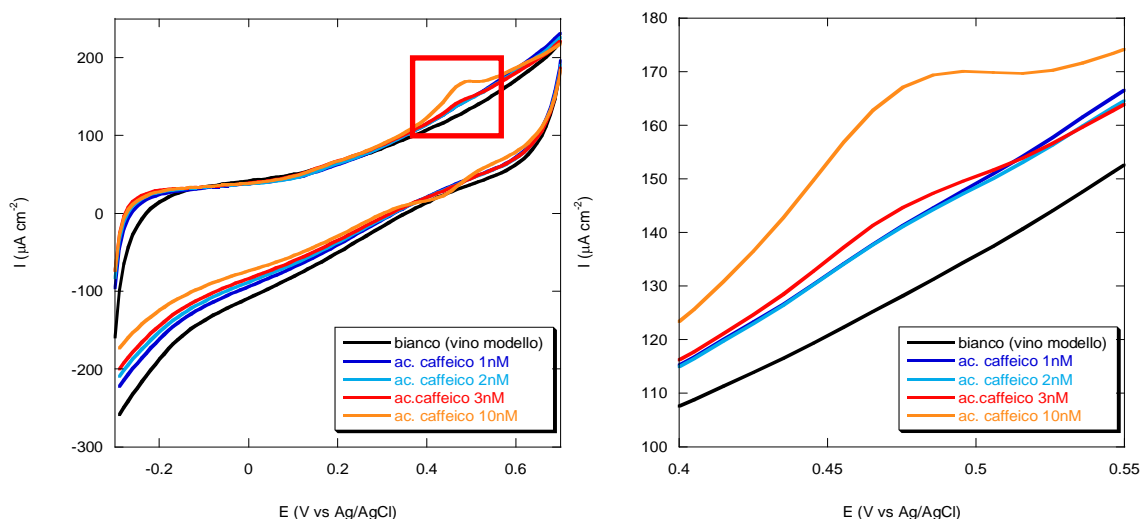
**LOQ = valore medio dei bianchi + 10 volte la deviazione standard dei bianchi.**

L'utilizzo pratico di LOD ed LOQ si traduce in questo modo:

- concentrazioni inferiori a LOD non sono rilevabili con quel metodo ( NR );
- concentrazioni comprese tra LOD e LOQ vengono riportate tra parentesi "( )";

- concentrazioni superiori a LOQ sono determinabili con quel metodo.

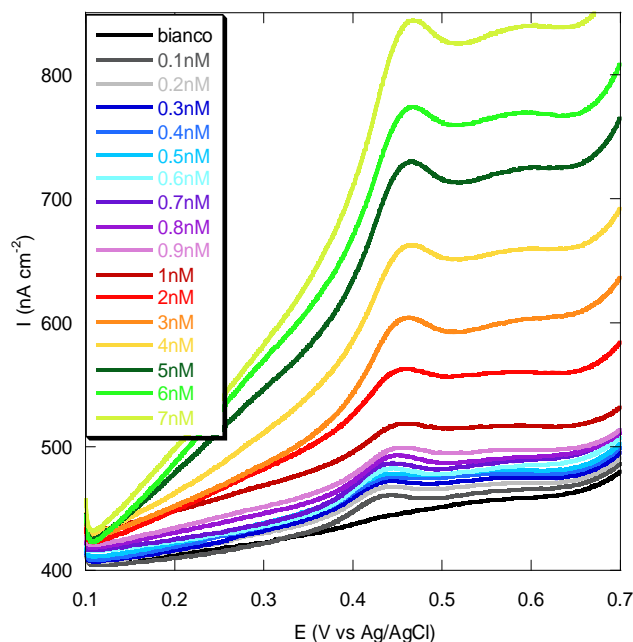
Da quanto appena detto il sistema rappresentato da Pt/PEDOT-PSS ha dimostrato di avere un limite di rilevabilità mediante analisi per VC a partire da 3nmol/l e un limite quantificabile di 10nmol/l, come dimostrato dai grafici di seguito riportati:



**Figura 113** Voltammogrammi relativi alle più basse concentrazioni per calcolare il LOD e LOQ. A destra si riporta l'ingrandimento della zona dove si osserva il picco di ossidazione dell'acido caffeico. Si vede chiaramente che la prima curva dove è possibile identificare un picco corrisponde a 3nmol l<sup>-1</sup>. Potenziale compreso tra -0.3V < E vs Ag/AgCl < 0.7 V, velocità di scansione 20mV/s.

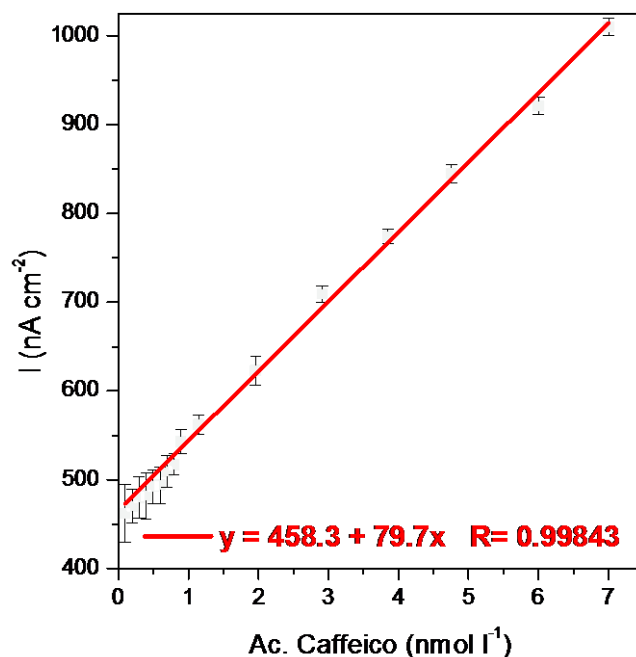
La voltammetria differenziale ad impulsi è una tecnica sensibile che consente di determinare valori di concentrazione più bassi di quelli valutabili per via voltammetrica in quanto consente di eliminare i contributi capacitivi alle correnti esaltando i contributi faradici della reazione in esame. Per questa ragione si è proceduto a questo tipo di analisi con condizioni operative che prevedono uno step di potenziale di 0.45mV e una modulazione di ampiezza pari a 55.05mV su un intervallo di potenziale che va da 0.1V a 0.7V vs Ag/AgCl.

Di seguito si riporta il grafico con tutte le scansioni di potenziale effettuate per concentrazioni crescenti di acido caffeico in soluzione di vino modello:



**Figura 114** Voltammogrammi registrati in DPV relativi all'aggiunta di acido caffeico in una soluzione modello di vino, a partire da concentrazioni pari a  $0.1\text{nmol l}^{-1}$  fino a  $7\text{nmol l}^{-1}$ .

Dal grafico si nota come già a partire da  $0.1\text{nmol l}^{-1}$ , si osserva un picco ben definito nella zona intorno a  $0.45\text{V}$  e che questo cresce proporzionalmente alla concentrazione di analita. Riportando l'andamento dell'area del picco registrato in funzione della concentrazione di acido caffeico, si ottiene il seguente grafico:



**Figura 115** Retta di taratura dell'acido caffeico relativa all'analisi mediante voltammetria differenziale ad impulsi, nella quale si riporta l'andamento dell'altezza del picco di ossidazione dell'analita in funzione della sua concentrazione ( $0.1\text{nmol l}^{-1}$  –  $7\text{nmol l}^{-1}$ ).

Si vede come il sistema risponde linearmente su tutto l'intervallo di concentrazione studiato (0.1nM-7nM) e che tramite la DPV si è potuto scendere di altri due ordini di grandezza (da 10nM a 0.1nM) per la determinazione dell'analita di interesse. La deviazione standard, riportata nel grafico in figura 115, è stata calcolata per 5 campioni di PEDOT sintetizzati e testati nelle medesime condizioni sperimentali.

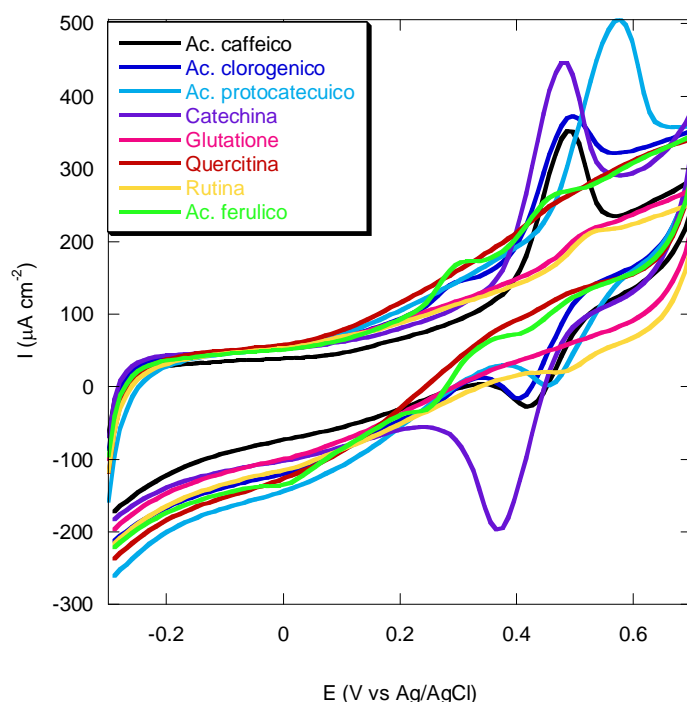
Di seguito si riporta la tabella dove si illustrano i dati relativi ai due diversi metodi di analisi quali voltammetria ciclica e voltammetria differenziale ad impulsi.

**Tabella 11** Dati relativi ai due differenti metodi di determinazione dell'acido caffeico nel vino modello

Metodo	Range di linearità	LOD	LOQ	Sensibilità	Durata	RSD (%)	Equazione
VC	10nM-6.5mM	3nM	10nM	$59.25 \mu\text{C l}/\text{mmol cm}^{-2}$	100'	9.4	$y(\mu\text{C}/\text{cm}^{-2})=11.8+59.25x(\text{mmol/l})$
DPV	0.1nM-10nM	0.1nM	0.1nM	$83.57 \text{nA l}/\text{nmol cm}^{-2}$	30'	7.9	$y(\text{nA}/\text{cm}^{-2})=458.3+79.7x(\text{nmol/l})$

Una volta valutata la stabilità del sistema (sia per VC che per DPV) in termini di riproducibilità e di limite di rilevabilità, si è proceduto con l'analisi random di soluzioni di acido caffeico (a titolo noto) per verificare, se interpolando la retta di taratura, fosse possibile ottenere un risultato attendibile. Questa procedura si è resa necessaria per verificare che non si manifestino fenomeni di fouling sulla superficie del PEDOT.

La determinazione dell'acido caffeico in campioni reali come i vini, presenta delle limitazioni dovute sia all'estrema complessità di tali soluzioni sia al fatto che sono presenti molte altre molecole che possono contribuire alla generazione del picco ossidativo nella stessa regione di potenziale dell'acido caffeico come dimostra la voltammetria ciclica in figura 116 effettuata per alcuni dei polifenoli contenuti nel vino.

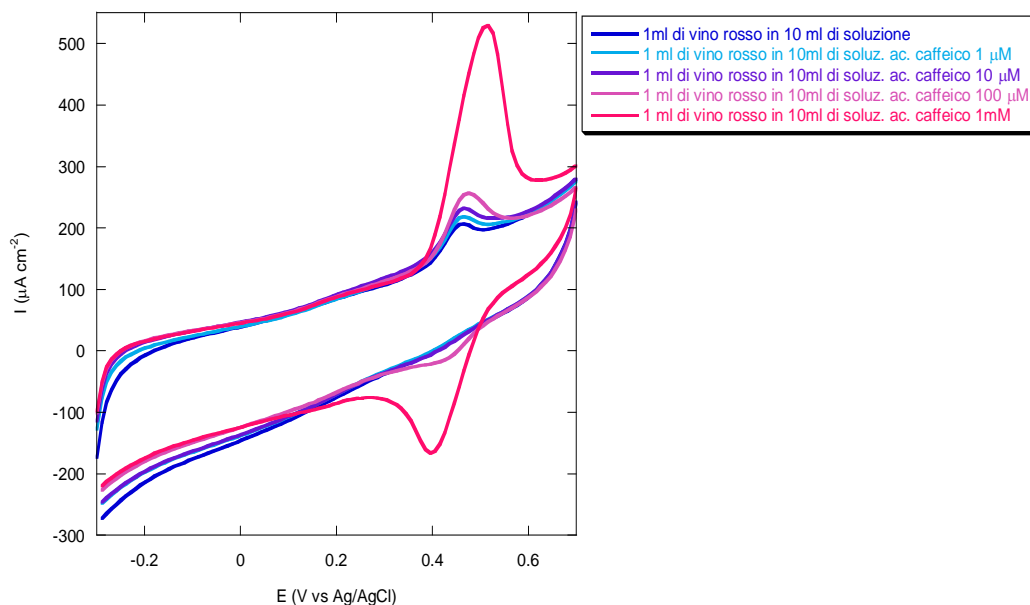


**Figura 116.** Voltammetria ciclica di diversi composti polifenolici (e altri interferenti) tra cui l'acido caffeico, l'acido clorogenico, l'acido protocatecuico, la catechina, il glutathione, la quercitina, la rutina e l'acido ferulico tutti alla concentrazione di 0.5mmol/l in soluzione di vino modello a pH 3.5. Potenziale compreso tra  $-0.3V < E \text{ vs Ag/AgCl} < 0.7 V$ , velocità di scansione 20mV/s.

Solo alcune specie chimiche come l'acido clorogenico e la catechina mostrano un picco di ossidazione sull'elettrodo modificato con PEDOT-PSS, tutti gli altri non mostrano una significativa risposta tale da poterli considerare come possibili interferenti. Effettuare un'analisi voltammetrica sul vino tal quale comporterebbe una determinazione del potere antiossidante dato dal contributo di tutti i polifenoli che si scaricano nella stessa regione di potenziale dell'acido caffeico. Per ovviare ai problemi della sovrastima della concentrazione, è stata effettuata la determinazione voltammetrica dell'acido caffeico nel vino mediante il metodo delle aggiunte standard che consiste nell'aggiunta di aliquote a concentrazione diversa della soluzione standard a quantità uguali della soluzione campione. Ogni soluzione è quindi diluita ad un volume prefissato e se ne misura la risposta elettrochimica. Le misure vanno eseguite sulla soluzione iniziale del campione e dopo ogni aggiunta. Una volta ottenuta (graficamente o con il metodo dei minimi quadrati) la retta, si valuta l'intersezione di tale retta con l'asse delle ascisse (il punto che si ricava dall'equazione della retta ponendo  $y = 0$ ). Il valore ottenuto, cambiato di segno corrisponde alla concentrazione dell'analita nel campione. Di seguito si riportano i voltammogrammi relativi a questo

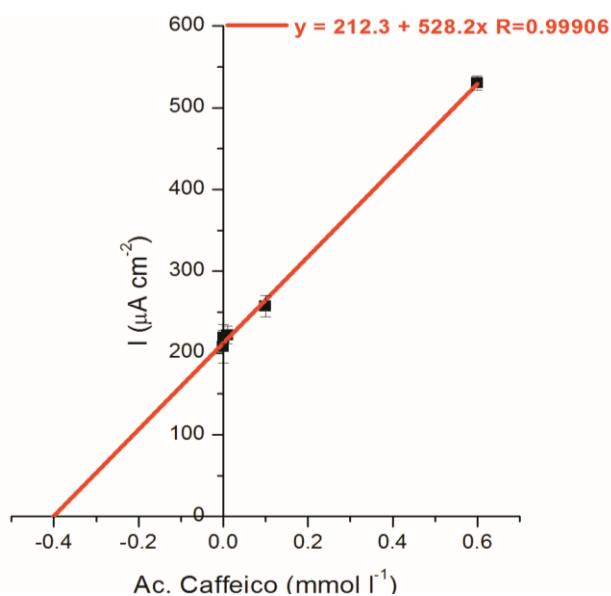


metodo utilizzato per la determinazione dell'acido caffeico in un campione di vino rosso diluito 1:10 in una soluzione di vino modello.



**Figura 117** Voltammetria ciclica per la determinazione dell'acido caffeico nel vino rosso con il metodo delle aggiunte standard. Potenziale compreso tra  $-0.3\text{V} < E \text{ vs Ag/AgCl} < 0.7 \text{ V}$ , velocità di scansione  $20\text{mV/s}$ .

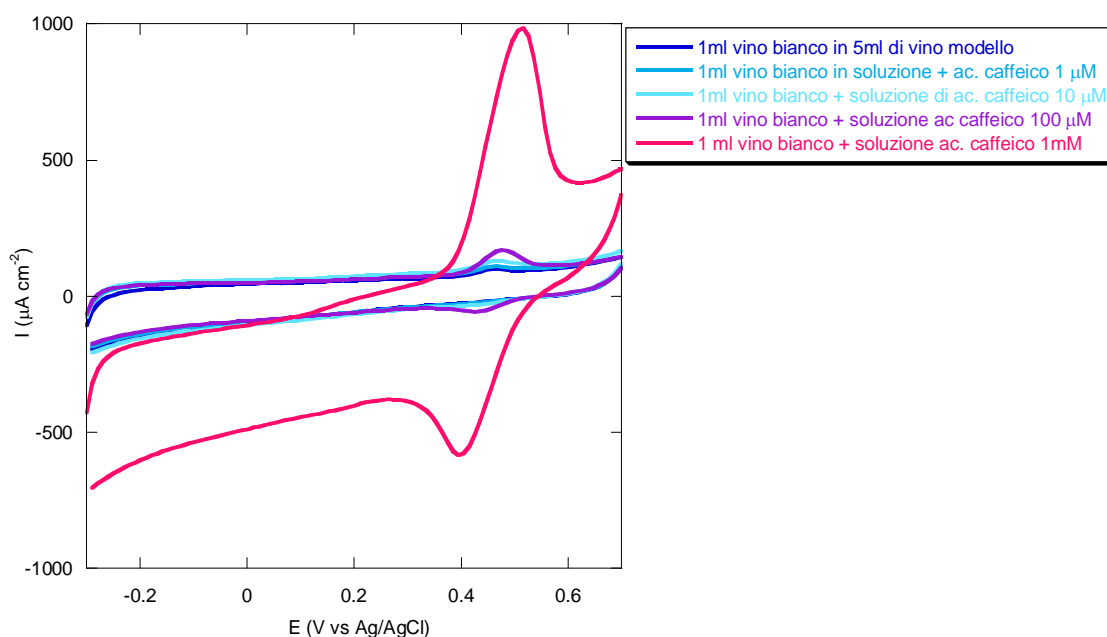
Si riporta anche la retta di taratura ricavata dalla lettura dell'intensità di corrente di picco associate ad ogni valore di concentrazione.



**Figura 118.** Retta di taratura ottenuta con il metodo delle aggiunte standard per un campione di vino rosso e relativo al grafico in figura 117. Si riporta l'intensità di picco anodica contro la concentrazione di acido caffeico aggiunto.

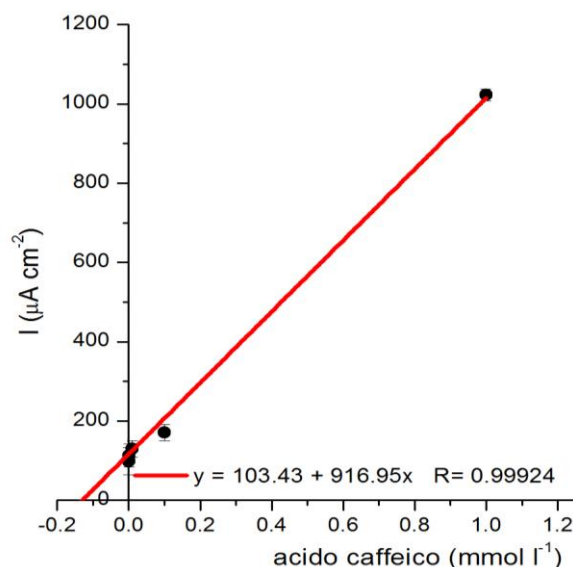
L'intercetta della retta sull'asse delle ascisse (cioè per  $y=0$ ) fornisce il valore della quantità di acido caffeico nel campione di vino rosso analizzato che risulta pari a 0.40mmol/l (72.4mg/l). Il calcolo della deviazione standard (RSD) è stato effettuato per determinazioni su cinque diversi campioni di elettrodi modificati con PEDOT-PSS.

Analogamente si riporta il grafico relativo alla determinazione dell'acido caffeico con lo stesso metodo in un campione di vino bianco diluito 1:5 con una soluzione di vino modello.



**Figura 119** Voltammetria ciclica per la determinazione dell'acido caffeico nel vino bianco con il metodo delle aggiunte standard. Potenziale compreso tra  $-0.3\text{V} < E \text{ vs Ag/AgCl} < 0.7 \text{ V}$ , velocità di scansione 20mV/s.

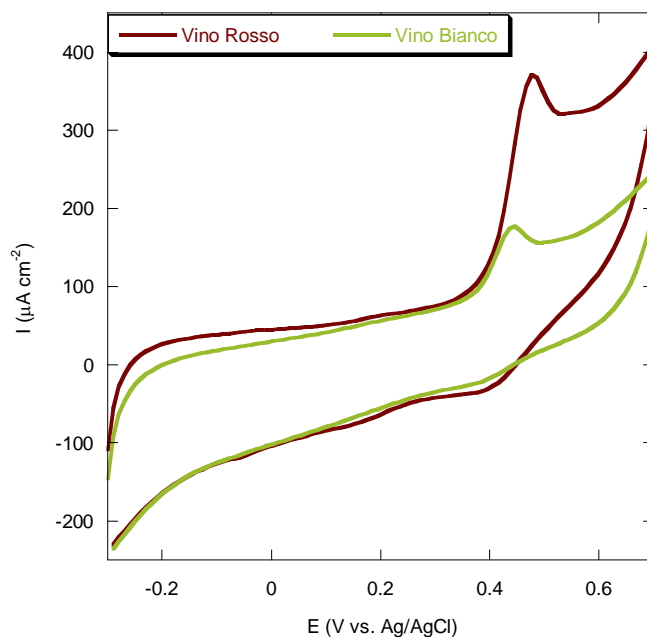
Si riporta anche la retta di taratura ricavata dalla lettura dell'intensità di corrente di picco associate ad ogni valore di concentrazione.



**Figura 120** Retta di taratura ottenuta con il metodo delle aggiunte standard per un campione di vino bianco e relativo al grafico in figura 119. Si riporta l'intensità di picco anodica contro la concentrazione di acido caffeico aggiunto.

Come precedentemente descritto, con l'extrapolazione a zero della retta ottenuta, si ottiene un valore di concentrazione di acido caffeico pari a 0.11mmol/l (19.8mg/l). Come atteso, la quantità di acido caffeico presente nel vino rosso è superiore rispetto a quella riscontrata nel vino bianco a causa del particolare processo di vinificazione del vino rosso mediante fermentazione del mosto con le vinacce che rilasciano il loro contenuto di polifenoli con l'aumentare del grado alcolico, impartendo anche il caratteristico colore rosso.

Quindi verificata la bontà del sistema, si è proceduto all'analisi dei campioni di vino tal quali per valutare il contributo antiossidante dell'acido caffeico rispetto a quello di tutti gli altri polifenoli presenti e in grado di dare un picco anodico nella stessa regione di potenziale. L'analisi è stata effettuata impostando le medesime condizioni sperimentali della voltammetria ciclica [237] e senza effettuare alcun tipo di pretrattamento dei due campioni (cioè utilizzando come soluzione elettrolitica il vino stesso precedentemente filtrato) e di seguito si riporta il grafico con le due curve.



**Figura 121** Voltammetria ciclica per la determinazione dei polifenoli totali in un campione di vino bianco e di vino rosso. Potenziale compreso tra  $-0.3\text{V} < E \text{ vs Ag/AgCl} < 0.7 \text{ V}$ , velocità di scansione  $20\text{mV/s}$ .

In base all'analisi dell'area dei picchi dei vini e dall'interpolazione della retta di taratura precedentemente ottenuta e riportata in tabella 11 per il metodo voltammetrico, i polifenoli totali nel vino rosso risultano pari a  $163,55\text{mg/l}$  di cui l'acido caffeico rappresenta il 44.3% (con  $72.4\text{mg/l}$ ) del totale e nel vino bianco i polifenoli totali risultano pari a  $46.8\text{mg/l}$  di cui l'acido caffeico rappresenta il 42.4% (con  $19.8\text{mg/l}$ ).

## 8.7 Poli(3,4-etilendioksi)tiofene e polietere uretano acido: risultati e discussioni

Il PEDOT, come polimero conduttore, ha dimostrato di possedere proprietà elettrochimiche prossime a quelle dei metalli tanto che gli consentono di abbassare notevolmente la sovratensione di ossidazione di analiti di interesse in campo clinico, diagnostico e ambientale. Purtroppo tale materiale non presenta gruppi funzionali reattivi sulla sua struttura (come ad esempio, -OH, -COOH e  $\text{NH}_2$ ), per cui non si rende idoneo alla funzionalizzazione con materiale biologico. Di conseguenza si è pensato di progettare un dispositivo nel quale, grazie all'uso combinato di due materiali polimerici, quali il PEDOT e il PEUA, si riesca a sfruttare l'attività elettrochimica del primo, per il dosaggio analitico, e il gruppo carbossilico del secondo, per l'aggancio di molecole biologiche, come ad esempio la glucosio ossidasi. Sperimentalmente si è puntato ad ottenere una matrice di PEUA ben adesa all'elettrodo di Pt e sufficientemente porosa tale da essere utilizzata da template per la successiva elettrodeposizione del PEDOT all'interno di queste porosità.

Sono state utilizzate due tecniche differenti di deposizione del PEUA sulla lamina di platino:

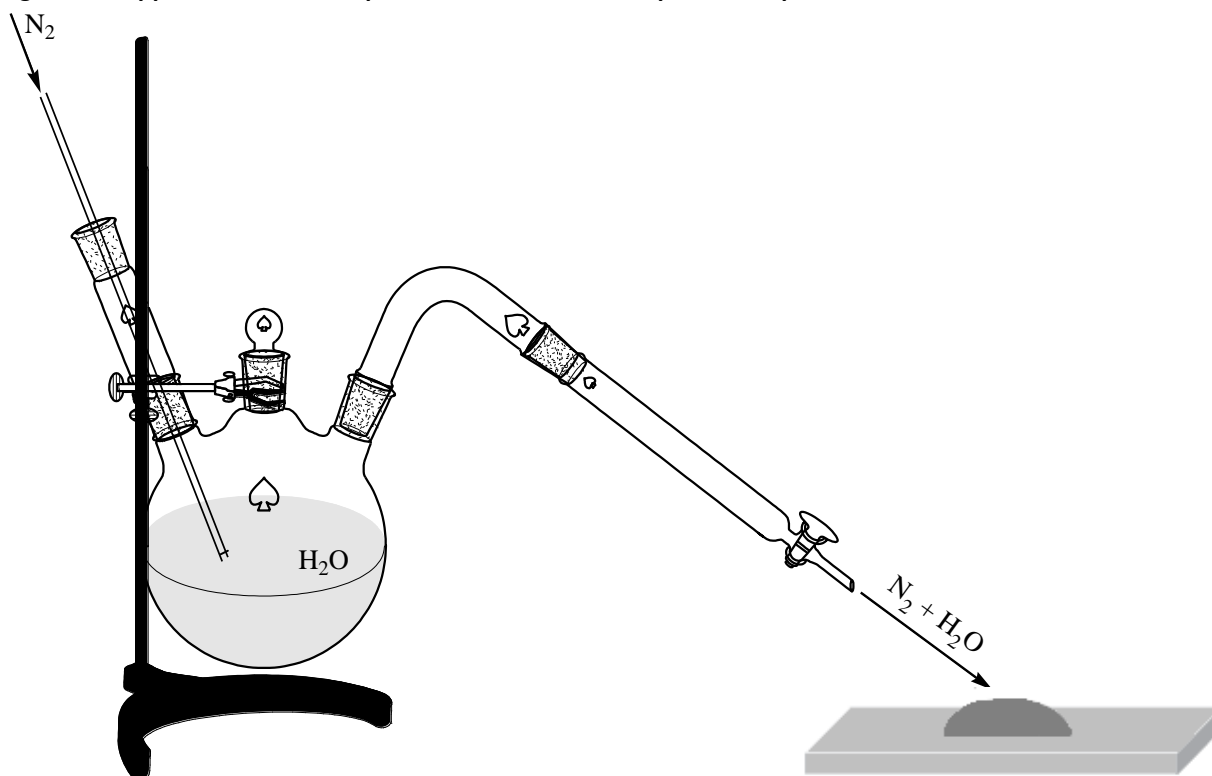
- a) mediante casting che è il metodo più comune di deposizione di film polimerici dissolti in opportuni solventi che vengono, poi, fatti evaporare.
- b) Con una tecnica di deposizione con un metodo di templating per la fabbricazione di film a struttura micro e nano porosa nota con il nome di *breath figures*.

Casting: si prepara una soluzione concentrata di polimero utilizzando come solvente il tetraidrofurano (THF). Dopo alcuni tentativi, è stato trovato che il rapporto in peso per ottenere una concentrazione ottimale è PEUA : THF = 1: 2.75. Una volta pronta questa soluzione si immerge al suo interno una lamina di platino. Fatto ciò si lascia asciugare la lamina a temperatura ambiente per 12 ore e la si conserva immersa in una soluzione di tampone fosfato (TF) a pH 7. Questo per permettere il rigonfiamento del PEUA necessario alla successiva elettropolimerizzazione del PEDOT al suo interno.

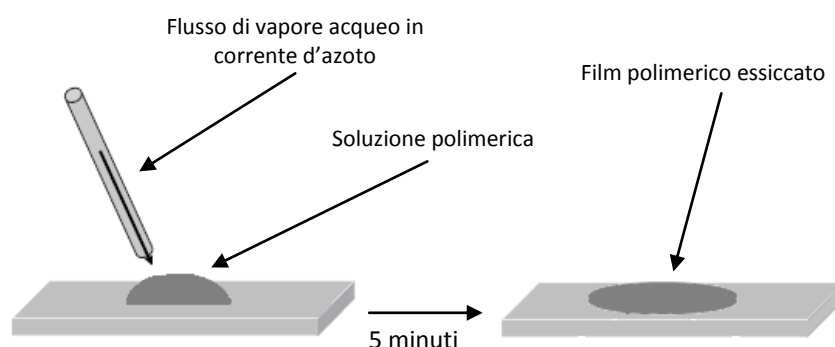
Breath Figures [243]: come detto si ottiene la formazione di una struttura polimerica porosa. Si prepara una soluzione diluita di polimero (PEUA) in un opportuno solvente

(cloroformio,  $\text{CHCl}_3$ ), il cui rapporto in peso è PEUA :  $\text{CHCl}_3 = 1:9$ . Con l'aiuto di una pipetta si preleva la soluzione polimerica e se ne deposita una goccia su una lamina di platino. Agendo in modo rapido per evitare che il solvente evapori preventivamente, si dirige un flusso di vapore acqueo in corrente di azoto sulla lamina. Di seguito è mostrato l'apparato assemblato:

**Figura 122** Apparato assemblato per formare una struttura polimerica porosa.



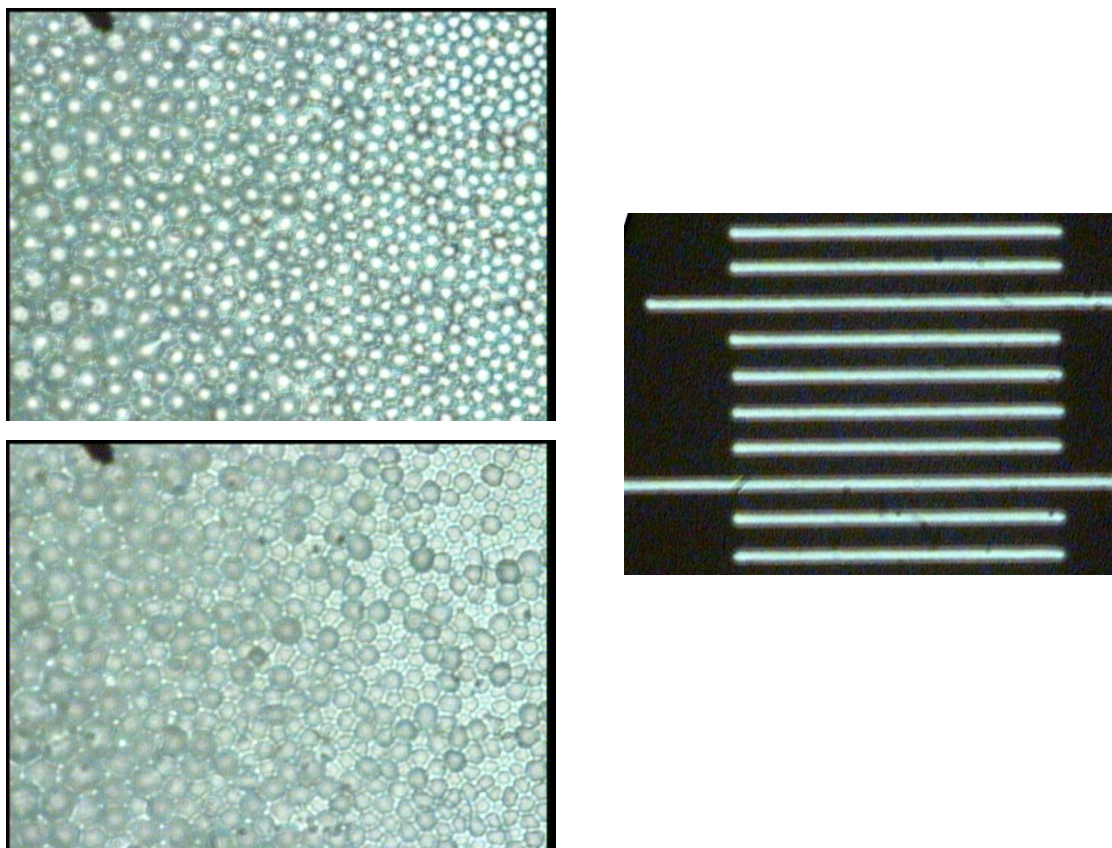
Dopo circa 5 minuti tutto il solvente è evaporato in un'atmosfera umida:



**Figura 123** Fasi della lavorazione del polimero.

Esaminando la lamina al microscopio ottico dopo averla lasciata essiccare, si vede che rimangono le forme microscopiche delle goccioline d'acqua precedentemente

mescolate con la soluzione polimerica e successivamente evaporate così che le breath figures rimangono “imprese” nella matrice polimerica:



**Figura 124** A sinistra: immagini al microscopio ottico delle breath figures. A destra: campione per il dimensionamento dei pori ottenuti: la distanza tra ogni tacca corrisponde a 10 micron.

Le membrane ottenute con entrambi i metodi sono state funzionalizzate e studiate. I risultati migliori sono stati ottenuti con la tecnica delle breath figures, quindi sono stati riportati in dettaglio solo i risultati riferiti alle membrane prodotte in questo modo.

L'elettrosintesi del PEDOT sull'elettrodo di Pt modificato con PEUA, è stata effettuata come precedentemente citato a pagina 120 [195,244-246] e qui di seguito viene riportato il grafico galvanostatico relativo alla sintesi del PEDOT in soluzione di PSS 0.1M su elettrodo di platino modificato mediante PEUA:

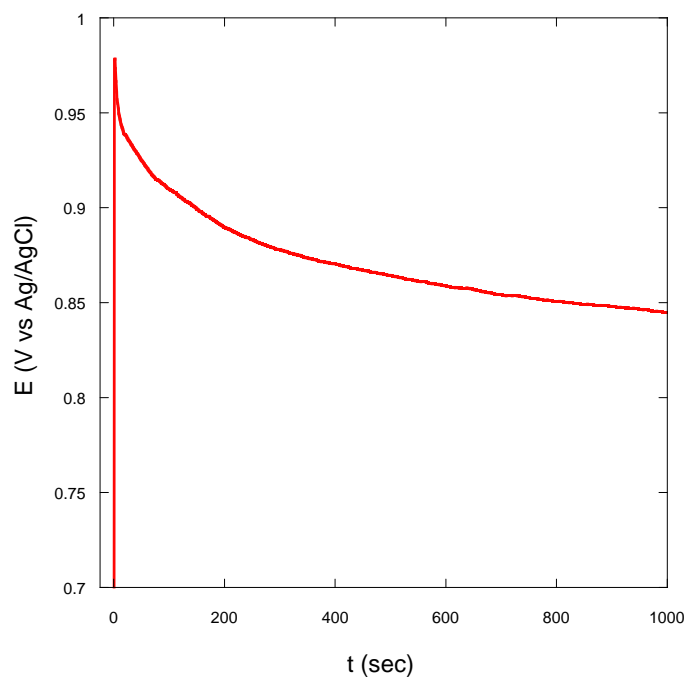


Figura 125 Andamento del potenziale vs. Ag|AgCl in funzione del tempo riferito all'elettrosintesi del PEDOT su PEUA.  $i=0.2\text{mA/cm}^2$  per  $t=1000\text{s}$ .

Sono state testate mediante EIS le risposte elettrochimiche del ferricianuro di potassio,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  0.01M in soluzione di KCl 0.2M, dell'elettrodo modificato con solo PEUA e dell'elettrodo modificato con PEDOT e PEUA. Di seguito si riporta il confronto dei due andamenti impedimetrici:

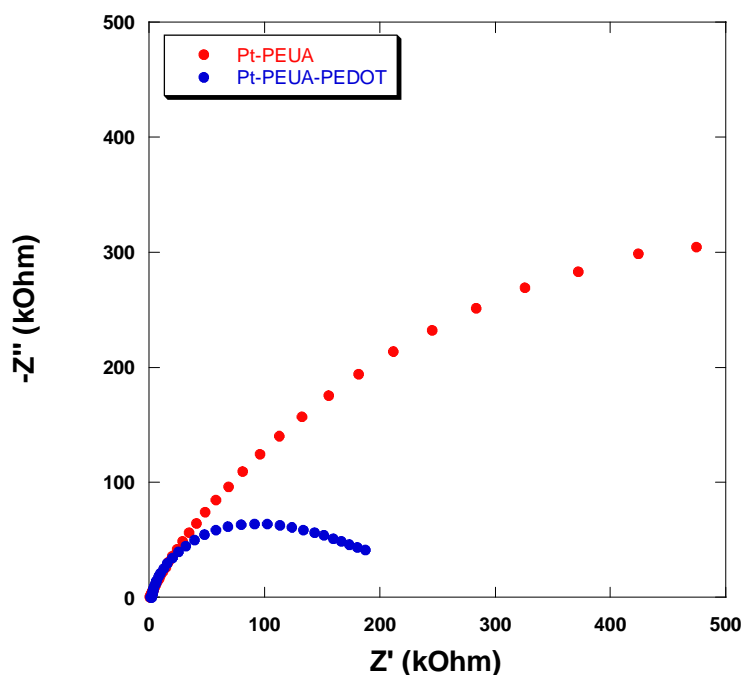


Figura 126 Confronto dell'analisi impedimetrica dell'elettrodo modificato con PEUA (curva rossa) e dell'elettrodo modificato con PEUA e PEDOT (curva blu) in soluzione di  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  0.01M in KCl 0.2M. Condizioni di circuito aperto; range di frequenza compreso tra 10kHz-0.01Hz.



Per quanto riguarda la lamina di platino modificata con il PEUA si nota che è stata ottenuta una risposta, nonostante questo sia un polimero non conduttore. Tale risposta è dovuta al fatto che il polimero è rigonfio e la soluzione elettrolitica di ferricianuro di potassio diffonde attraverso lo strato fino all'interfase elettroica.

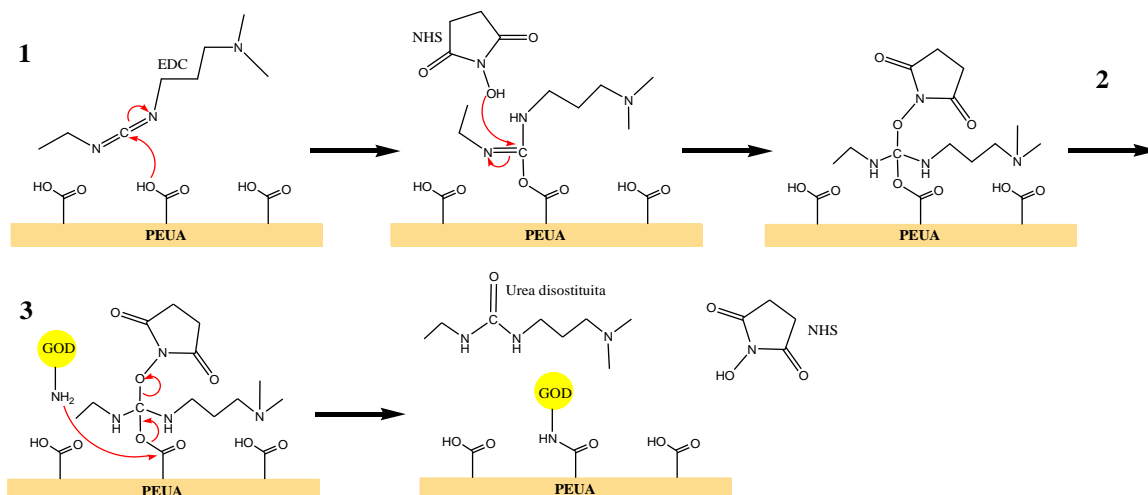
Nel caso della lamina su cui è stato sintetizzato il PEDOT all'interno delle cavità del PEUA, si vede che in questo caso c'è una resistenza al trasferimento di carica più bassa (semicerchio con diametro minore) dovuta alla scarica del ferricianuro sul PEDOT, polimero conduttore, e non sul platino.

La successiva immobilizzazione della GOD, sull'elettrodo modificato con PEUA e PEDOT, è stata effettuata mediante l'ausilio di agenti di coupling, sfruttando il gruppo funzionale carbossilico presente nel PEUA. Tale modalità di immobilizzazione avviene in soluzione acquosa utilizzando una coppia di reagenti: N-(dimetilammino)propil-N'-etilcarbodimide (EDC) e N-idrossi-succinimide (NHS) [194], grazie ai quali è stato possibile attivare il gruppo carbossilico del PEUA su cui si andrà a legare il gruppo amminico della GOD. Questa procedura è già stata utilizzata per l'aggancio dell'enzima sui nanotubi modificati con il polipirrolo overossidato ma in quel caso l'attivazione dei gruppi carbossilici avveniva sull'enzima e non sul materiale polimerico (vedi anche figura 67).

Le vie di immobilizzazione sono state di due tipi, ad uno e a tre stadi:

- a) **1 stadio**, via EDC/NHS: l'elettrodo di platino modificato è stato immerso per 1.5 ore in una soluzione di tampone fosfato a pH 6.3 contenente 200 U/ml di GOD, EDC ad una concentrazione di 0.015M e NHS ad una concentrazione di 0.03M. Il solvente TF utilizzato è a pH 6.3 ed ha una concentrazione 0.1M. La soluzione con immerso l'elettrodo è stata lasciata sotto agitazione per 1.5 ore.
- b) **3 stadi**, via EDC/NHS con una iniziale preattivazione dei gruppi funzionali carbossilici sull'elettrodo modificato:
  1. l'elettrodo modificato è immerso in una soluzione contenente EDC ad una concentrazione 0.015 M e NHS ad una concentrazione 0.03 M in tampone fosfato (TF) 0.1 M a pH 6.3 ed è stata mantenuta in agitazione per 1 ora.
  2. L'elettrodo modificato preattivato è stato lavato in acqua distillata.
  3. L'elettrodo modificato è stato immerso in una soluzione contenente 400 U/ml di GOD mantenendo l'agitazione per 1 ora

Di seguito si riporta il meccanismo di attacco dell'enzima sul gruppo carbossilico del PEUA:

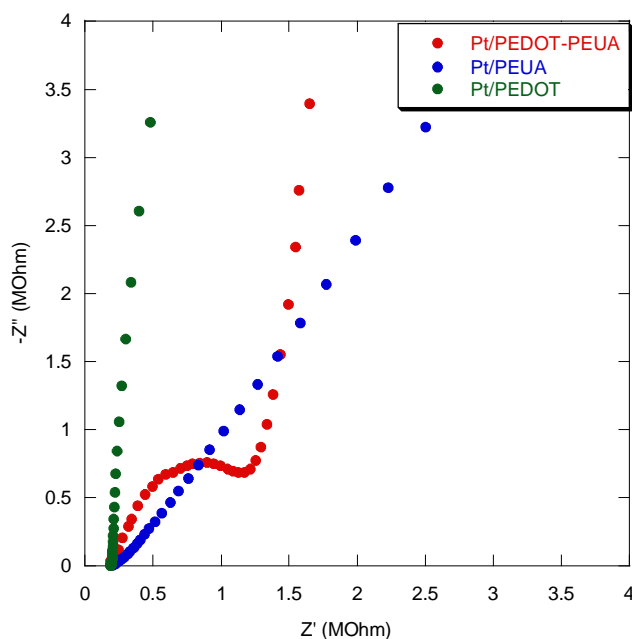


**Figura 127** Meccanismo di attacco dell'enzima GOD sui gruppi carbossilici del PEUA.

I risultati ottenuti nei due casi, rispetto alla risposta al glucosio, indicano la procedura a tre stadi come la migliore via di immobilizzazione. Questo perché probabilmente nella procedura ad uno stadio possono verificarsi possibili ammidazioni inter ed intra catena prima che l'enzima riesca a legarsi alla matrice polimerica di PEUA. Quindi nella restante parte del lavoro sono stati riportati solo risultati relativi all'immobilizzazione a tre stadi.

Allo scopo di verificare, in via preliminare, la possibilità di assemblare un biosensore, è stata studiata la risposta dell'elettrodo modificato con PEUA-PEDOT in presenza di acqua ossigenata ( $H_2O_2$ ) in soluzione di tampone fosfato 0.1M a pH 7. E' stato utilizzato questo analita poiché è il prodotto reattivo della catalisi enzimatica del glucosio ed era necessario studiare la stabilità dell'elettrodo in presenza di tale molecola.

Per confronto, di seguito è mostrato il diagramma di Nyquist comparativo relativo alle analisi di tre elettrodi diversamente modificati: uno con solo PEUA, uno con solo PEDOT e uno con la matrice interpenetrata di PEUA-PEDOT.



**Figura 128** Confronto delle risposte impedimetriche degli elettrodi Pt-PEUA-PEDOT (in rosso), Pt-PEUA (in blu), Pt-PEDOT (in verde), in una soluzione elettrolitica contenente  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1mM. Condizioni di circuito aperto; range di frequenza compreso tra 10kHz-0.01Hz.

Dal confronto delle risposte relative al trasferimento di carica è possibile notare che per il campione Pt/PEUA-PEDOT si ha una situazione vantaggiosa rispetto ai campioni Pt/PEUA e Pt-PEDOT. Infatti, gli andamenti degli spettri riportati nel grafico in figura 128, dimostrano che sull'elettrodo modificato con solo PEDOT, l'elemento circuitale predominante è la resistenza dell'elettrolita mentre su quello modificato con solo PEUA, l'elemento predominante è la diffusione dell'analita attraverso il polimero stesso. Il fatto che sia possibile vedere il fenomeno del trasferimento di carica sulla matrice di PEUA-PEDOT e non sul solo PEDOT è spiegabile grazie alla presenza stessa del PEUA il quale rallenta la cinetica di questo fenomeno che sul solo PEDOT è interamente mascherato dalla resistenza dell'elettrolita all'interfase elettrochimica. Questi dati ci consentono di considerare questa matrice di polimeri interpenetrati, adatta per la successiva funzionalizzazione con l'enzima GOD. Sono state poi condotte, una volta elettrosintetizzato il PEDOT sull'elettrodo Pt-PEUA, prove impedimetriche a diverse concentrazioni di acqua ossigenata per valutare l'entità della variazione della risposta in  $R_{ct}$ :

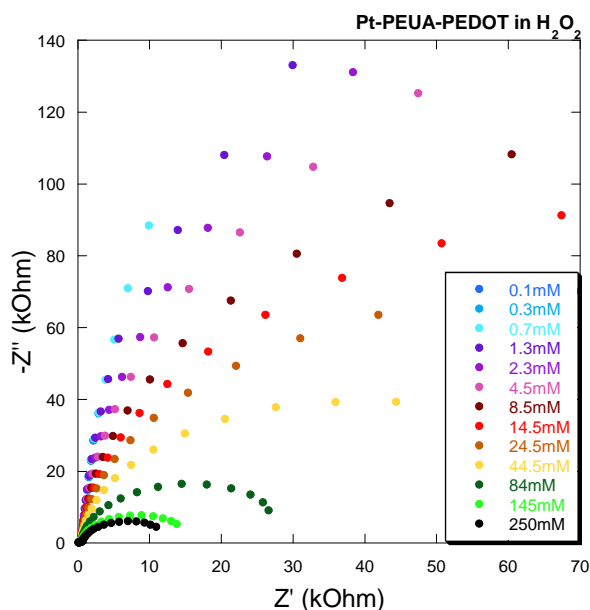


Figura 129 Risposta impedimetrica dell'elettrodo Pt-PEUA-PEDOT a concentrazioni crescenti di acqua ossigenata. Condizioni di circuito aperto; range di frequenza compreso tra 10kHz-0.01Hz.

Dal grafico sopra riportato è possibile notare la costante diminuzione della resistenza al trasferimento di carica all'aumentare della concentrazione di  $H_2O_2$ . Di seguito è illustrato il grafico nel quale si riporta reciproco del valore di  $R_{ct}$  in funzione della variazione di concentrazione dell' $H_2O_2$ :

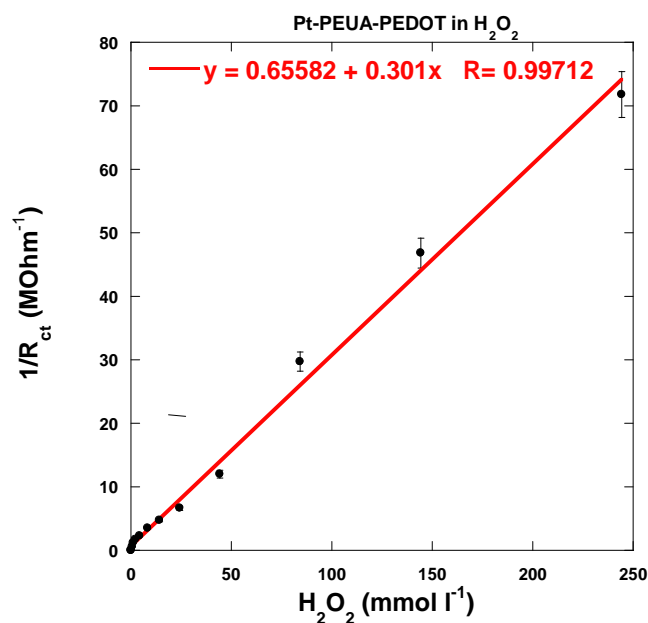


Figura 130 Grafico della risposta in  $R_{ct}$  del sensore Pt/ PEDOT-PEUA in funzione di concentrazioni crescenti di acqua ossigenata.

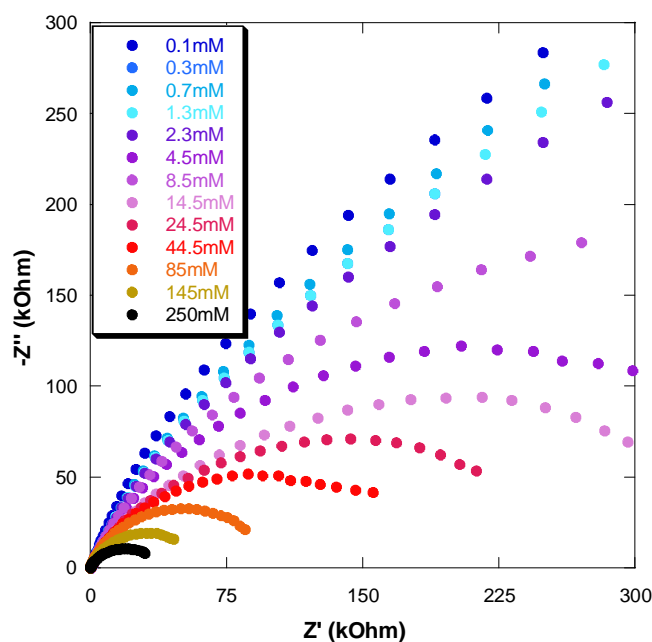
La risposta del sensore è risultata essere buona nel range di concentrazione dell' $H_2O_2$  che va da 0.1mM a 250mM. La deviazione standard, riportata nel grafico in figura , è

stata calcolata per 5 campioni di PEDOT-PEUA sintetizzati e testati nelle medesime condizioni sperimentali. Le caratteristiche del metodo analitico possono essere riassunte nella seguente tabella.

**Tabella 12** Tabella riassuntiva delle caratteristiche del metodo di determinazione analitica di  $H_2O_2$

Metodo	Range di linearità	LOD	LOQ	Sensibilità	Durata	RSD (%)	Equazione
EIS	0.1-250mmol/l	0.05mmol/l	0.1mmol/l	0.3 l/k $\Omega$ mmol	100''	8.2	$y=0.65+0.30x$
Utilità	Campo clinico per la determinazione del grado di stress ossidativo cellulare responsabile dell'invecchiamento e deterioramento strutturale.						

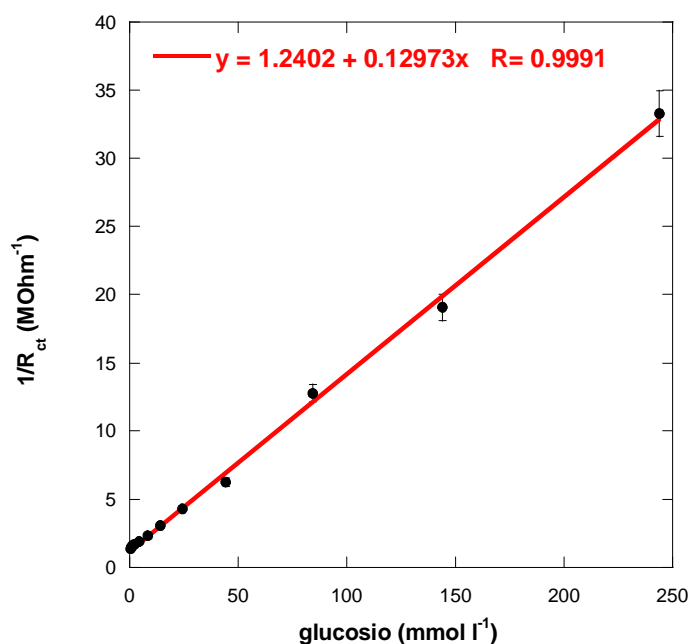
In figura 131 sono stati riportati gli spettri registrati per concentrazioni di glucosio via via crescenti per il biosensore completamente assemblato.



**Figura 131** Risposta impedimetrica del biosensore Pt/PEDOT-PEUA/GOD a concentrazioni crescenti di glucosio. Condizioni di circuito aperto; range di frequenza compreso tra 10kHz-0.01Hz.

Con questi dati ottenuti è stato possibile costruire una retta di calibrazione utilizzando i valori ottenuti dai reciproci delle  $R_{ct}$  in funzione delle concentrazioni di glucosio testate e inoltre la deviazione standard, riportata nel grafico in figura 132, è stata

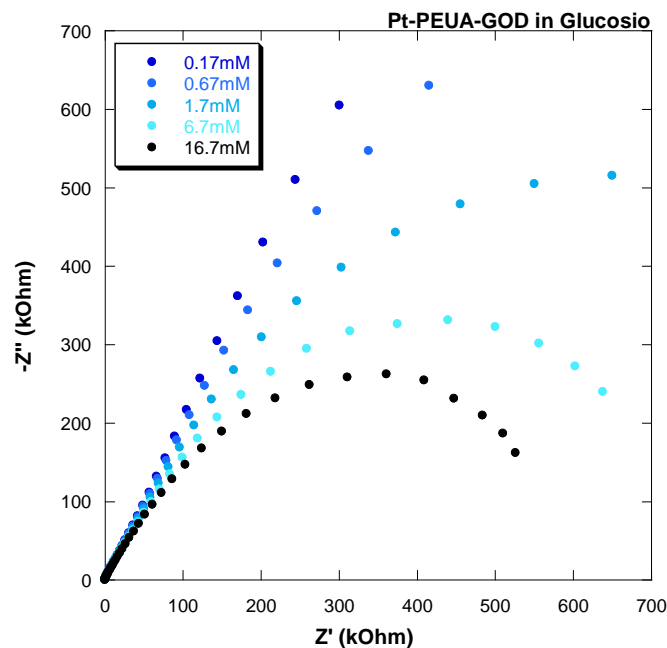
calcolata per 5 campioni del biosensore finale e testati nelle medesime condizioni sperimentali.



**Figura 132** Grafico della risposta in  $R_{ct}$  del biosensore Pt/PEDOT-PEUA/GOD in funzione di concentrazioni crescenti di glucosio. L'inserto mostra il range di concentrazione nel quale tale dispositivo mostra un andamento lineare.

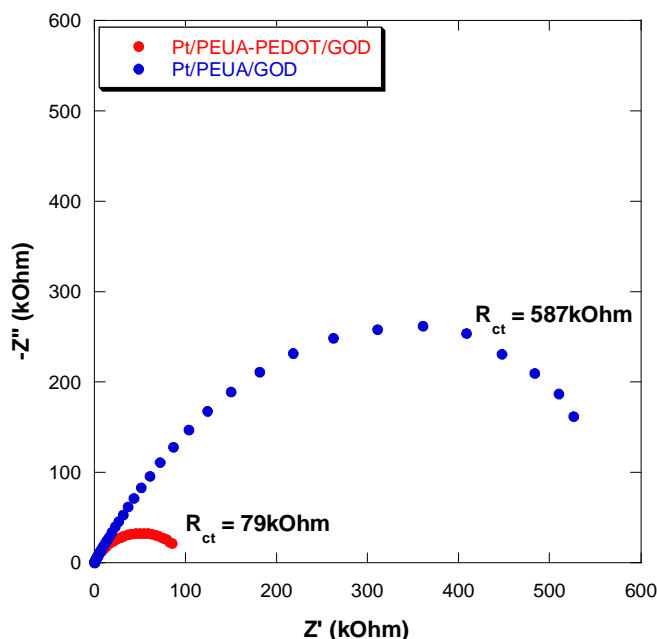
Il grafico evidenzia l'intervallo di linearità di tale biosensore, che cade nel range di concentrazione che va da 0.1mM a circa 250mM.

Per valutare il reale vantaggio della matrice composita PEDOT-PEUA rispetto alla sola matrice del PEUA, quest'ultimo polimero è stato funzionalizzato con l'enzima e il dispositivo biosensoristico così ottenuto è stato testato sempre con soluzioni di glucosio a concentrazione crescente. La figura 133 illustra la risposta impedimetrica dell'elettrodo Pt/PEUA/GOD:



**Figura 133** Risposta impedimetrica dell'elettrodo Pt-PEUA-GOD in una soluzione elettrolitica di glucosio a valori di concentrazione crescenti. Condizioni di circuito aperto; range di frequenza compreso tra 10kHz-0.01Hz.

Come aspettato sono stati ottenuti spettri di impedenza relativi alla reazione di trasferimento di carica dell'acqua ossigenata, prodotta dall'attività enzimatica della glucosio ossidasi, sul Pt attraverso i pori del PEUA che lasciano scoperto il Pt sottostante ma l'entità di tale risposta non è paragonabile a quella del sistema PT/PEUA-PEDOT/GOD. Infatti, in figura 134 sono riportati gli spettri dei due dispositivi registrati alla stessa concentrazione di glucosio, da cui si evince una maggiore sensibilità nel sistema contenente il PEDOT in intimo contatto con il PEUA, espresso da una minore  $R_{ct}$ :

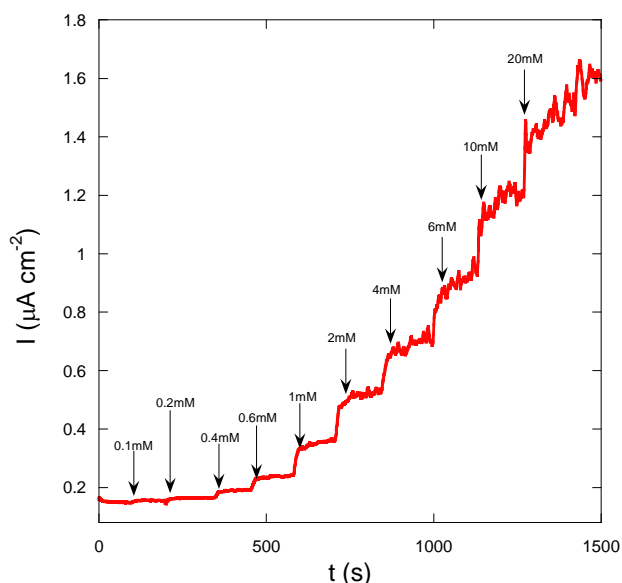


**Figura 134** Spettro di impedenza per due biosensori per il glucosio i quali differiscono per la presenza del PEDOT. Condizioni di circuito aperto; range di frequenza compreso tra 10kHz-0.01Hz.

Lo studio della funzionalità del dispositivo è stato effettuato anche per via amperometrica ad un valore di potenziale pari a  $E=+0.6V$  (vs  $Ag|AgCl$ ).

L'indagine è stata finalizzata a studiare l'entità della risposta in corrente, quando nella cella elettrochimica vengono effettuate delle aggiunte di glucosio a concentrazione via via crescente.

L'andamento di tale risposta è illustrato nel seguente grafico:

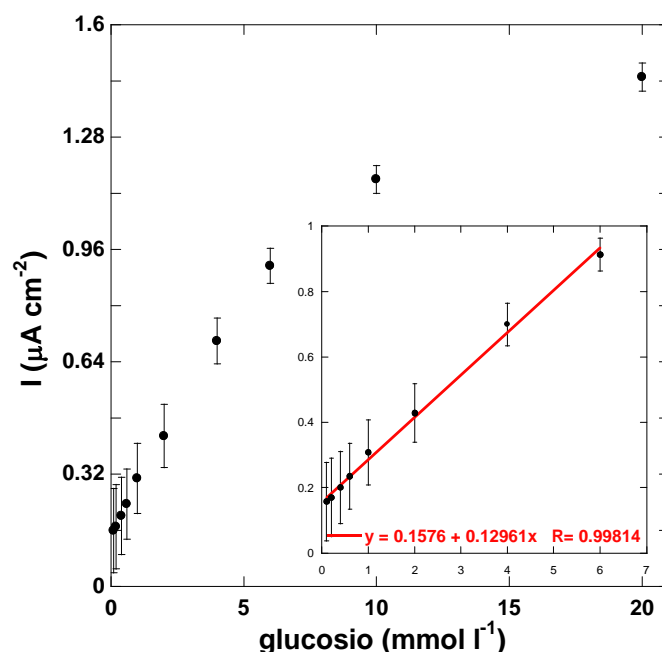


**Figura 135** Cronoamperometria sul biosensore Pt-PEUA-PEDOT-GOD in presenza di glucosio a concentrazioni crescenti.  $E$  (vs  $Ag|AgCl$ )= $+0.6V$  per  $t=1500s$ .



Dove si nota la variazione della corrente, ad ogni aggiunta della soluzione di glucosio, in funzione del tempo.

Graficando il valore di suddetta corrente, in funzione della concentrazione del glucosio, si ottiene un andamento del seguente tipo:



**Figura 136** Grafico della risposta in densità di corrente del biosensore Pt/PEUA-PEDOT/GOD in funzione di concentrazioni crescenti di glucosio. L'inserto mostra il range di concentrazione nel quale tale dispositivo mostra un andamento lineare.

Nell'inserto all'interno del grafico si evidenzia l'intervallo di linearità di tale biosensore, che cade nel range di concentrazione che va da 0.1mM a 4mM. La deviazione standard riportata è stata calcolata per 5 campioni di Pt/PEDOT-PEUA/GOD sintetizzati e testati nelle medesime condizioni sperimentali.

I dettagli dei due metodi analitici vengono riassunti nella seguente tabella:

**Tabella 13** Tabella riassuntiva dei dati caratterizzanti i due metodi per l'elettrodo di Pt con PEDOT-PSS/PEUA/GOD

Metodo	Range di linearità	LOD	LOQ	Sensibilità	Durata	RSD (%)	Equazione
EIS	0.1-250mmol/l	0.05mmol/l	0.1mmol/l	0.13 l/MΩ mmol	100''	5.1	$y=0.13x+1.24$
AMPERO	0.1-6mmol/l	0.001mmol/l	0.1mmol/l	0.13μA l/cm <sup>2</sup> mmol	120''	10.6	$y=0.13x+0.16$
Utilità	Determinazione del glucosio nel sangue intero o nel siero per pazienti sani o affetti da iperglicemia e/o diabete in quanto i livelli fisiologici di questo zucchero nel sangue sono compresi tra 3.3-3.9mmol/l per soggetti sani e a digiuno e maggiori di 6.7mmol/l per soggetti iperglicemi e/o diabetici.						

Le risposte elettrochimiche ottenute mediante le due tecniche hanno dimostrato che la matrice polimerica del PEUA risulta efficace per l'attacco enzimatico mentre quella del PEDOT conferisce sensibilità alla determinazione dell'acqua ossigenata prodotto dalla catalisi del glucosio. Inoltre l'analisi per mezzo della spettroscopia di impedenza ha permesso determinazioni in un intervallo di concentrazione molto più ampio rispetto a quello ottenuto per mezzo della cronoamperometria.

## 8.8 Conclusioni

Il lavoro di questa tesi dottorato è stato finalizzato allo studio di diversi materiali per indagarne le possibili applicazioni in dispositivi sensoristici e biosensoristici.

Il polipirrolo overossidato (OPPy), come polimero non conduttore, ha dato ottimi risultati in termini di stabilità meccanica ed elettrochimica come è stato possibile vedere dalle analisi SEM. Questo ci ha permesso di poterlo considerare un ottimo candidato come materiale per il supporto dell'enzima glucosio ossidasi per la determinazione del glucosio. Infatti, data la buona risposta lineare all' $\text{H}_2\text{O}_2$  (prodotto elettroattivo dell'attività catalitica enzimatica) tramite spettroscopia di impedenza elettrochimica, si è potuto procedere alla sua successiva funzionalizzazione mediante elettroassorbimento ottenendo così un dispositivo biosensoristico con una buona stabilità e buone performance in un interessante intervallo di concentrazione utile, ad esempio, nel controllo dei processi produttivi nell'industria alimentare (come nel controllo del grado di fermentazione del mosto d'uva) e, con le opportune modifiche, in campo clinico (come per il dosaggio del glucosio in sangue, saliva o urine).

I AuNTs tal quali, utilizzati come sensori per  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hanno consentito la sua determinazione analitica in un ampio intervallo di concentrazione e questo ha gettato le basi per lo sviluppo di un dispositivo biosensoristico basato su enzimi ossidasi (la GOD rappresenta sia un esempio che un modello). L'integrazione dei nanotubi con il polipirrolo overossidato ha consentito di sviluppare un materiale composito con le adeguate caratteristiche di permselettività utili per poter effettuare test su matrici di campioni reali.

Inoltre, durante lavoro di tesi è stata valutata l'importanza, l'applicabilità e l'attività elettrochimica del polimero conduttore poli(3,4-etilendiossi)tiofene (PEDOT), sintetizzato in mezzi convenzionali e non (quali una soluzione acquosa di PSS e il liquido ionico  $\text{PYR}_{14}\text{TFSI}$ ) come materiale in grado permettere determinazioni analitiche per molecole di interesse biologico come neurotrasmettitori, ormoni, anticorpi e altri metaboliti endogeni. Particolarmente interessante è stata la possibilità di poter applicare questo materiale per la determinazione analitica dell'acido caffeico (anche in questo caso interessante per il controllo del grado di fermentazione del

mosto d'uva) su un intervallo di concentrazione compreso tra le picomoli e le millimoli per litro.

La sua buona risposta elettrochimica, unitamente all'assenza di gruppi chimici funzionalizzabili, ha reso possibile per il PEDOT, l'affiancamento con un secondo materiale polimerico, quale il PEUA, per l'assemblaggio di un dispositivo analitico per il dosaggio del glucosio, con buone prestazioni in termini di sensibilità e sensitività.

L'uso della spettroscopia di impedenza elettrochimica ha reso questo lavoro originale ed innovativo e, soprattutto, ha dato dimostrazione della validità di tale metodologia elettrochimica rispetto a quelle più classiche come la cronoamperometria e la voltammetria ciclica.

## Bibliografia

1. Wehner R., "Matched filters – neural models of the eternal world", J Comp Physiol A, **2001**, 161: 511-531
2. Muller R.S., Howe R.T., Senturia St.D., Smith R.L., White R.M., Microsensors IEEE Press: New York, **1991**
3. De Raolj N.F., "Current status and future trends of silicon microsensor", Proceedings of Transducers, San Francisco, **1991**, pp79-86
4. Wise K.D., Najafi N., "The coming opportunities in microsensor systems", Proceedings of Transducers. San Francisco, **1991**, pp 2-7
5. Benecke W., Petzold H.C., Proceeding IEEE: Micro Electro Mechanical Systems, **1991** Travemünde
6. Bundesministerium für Forschung und Entwicklung, **1992**, Biosensorik. Bonn
7. Corcoran E., Nanotechnik. Spectrum Wiss, Jan **1991**, 76-86
8. Clark L.C., Lyons C., "Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery", Ann NY Acad Sci, **1962**, 102, 29-45
9. Coulet P.R., "What is a biosensor", Biosensor: principles and applications, **1991**, pag. 1-6
10. Blum L.J., Coulet Eds P.R., Gerard M., Chaubey A., Malhotra B.D., "Application of conducting polymers to biosensors", Biosensors Bioelectron, **2002**, 17, 345-359
11. Turner A.P.F., "Biosensor: Realities and aspiration", Annali di Chimica, **1997**, 87, 255-260
12. Turner A.P.F., "Biosensor – sense and sensitivity", Science, **2000**, 290: 1315-1317
13. Cornell B.A., "A biosensor that use ion channel switches", Nature, **1997**, 387, 580-583
14. Botting R., "Paracetamol-inhibitable COX-2", J Physiol Pharmacol., **2000**; 51, 609-618
15. Graham G.G., Scott K.F., "Mechanism of action of paracetamol", Am J Ther., **2005**, 12(1), 46-55

16. Gorton H.C., Jarvis K., "The effectiveness of vitamin C in preventing and relieving the symptoms of virus-induced respiratory infections", *J Manipulative Physiol Ther.*, **1999**, 22(8), 530-533
17. Creagan F.T., Moertel C.G., O'Fallon J.R., "Failure of high-dose vitamin C (ascorbic acid) to benefit patients with advanced cancer: a controlled trial", *N Eng J Med*, **1979**; 301, 687-690
18. Khaw K.T., Bingham S., Welch A., Luben R., Wareham N., Oakes S., Day N., "Relation between plasma ascorbic acid and mortality in men and women in EPIC-Norfolk prospective study: a prospective population study", *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Lancet.*, **2001**, 357(9257), 657-663
19. Chen Q., Espey M.G., Sun A.Y., Lee J.H., M.C. Krishna M.C., Shacter E., Choyke P.L., Pooput C., Kenneth L.K., Buettner G.R., Levine M., "Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues", *PNAS*, **2005**, 102, 13604–13609
20. Chen Q., Espey M.G., Sun A.Y., Lee J.H., M.C. Krishna M.C., Shacter E., Choyke P.L., Pooput C., Kenneth L.K., Buettner G.R., Levine M., "Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo", *PNAS*, **2007**, 104, 8749-8754
21. Gullu H., Erdogan D., Caliskan M., Tok D., Kulaksizoglu S., Yildirim A., Muderrisoglu H., "Elevated serum uric acid levels impair coronary microvascular function in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy", *Eur J Heart Fail.*, **2007**, 9, 466-68
22. Kawamoto R., "Relationship between serum uric acid concentration, metabolic syndrome and carotid atherosclerosis", *Intern Med.*, **2006**, 45(9), 605-614
23. George J., "High-dose allopurinol improves endothelial function by profoundly reducing vascular oxidative stress and not by lowering uric acid", *Circulation*. **2006**, 114(23), 2508-16
24. Li H., Guo A., Wang H., "Mechanisms of oxidative browning of wine", *FoodChemistry*, **2008**, 108, 1–13
25. Castellari, Sartini, Fabiani, Arfelli, Amati, **2002**

26. Makhotkina O., Kilmartin P. A., "The use of cyclic voltammetry for wine analysis: Determination of polyphenols and free sulfur dioxide", *Analytica Chimica Acta*, **2010**, 668, 155–165
27. Fracassetti D., Lawrence N., Tredoux A.G.J., Tirelli A., Nieuwoudt H.H., Du Toit W.J., "Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method", *Food Chemistry*, **2011**, 128, 1136–1142
28. Donggeun S., Hyo-Shin K., Dongho L., Seong S.J., Kwuang W.H., So-Young P., "Protective effect of caffeic acid against beta-amyloid-induced neurotoxicity by the inhibition of calcium influx and tau phosphorylation", *Life Sciences*, **2009**, 84, 257-262
29. Robbins R.J., *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 2866
30. Filipiak M., *Anal. Sci.* **2001**, 17, 1667
31. Nardini A., Ghiselli A., *Food Chem.*, **2004**, 84, 137
32. Romani A., Minunni M., Mulinacci N., Pinelli P., Vincieri F.F., *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 1197
33. Peng Y.Y., Liu F.H., Ye J.N., *Electroanalysis*, **2005**, 17, 356
34. Souza W.R., Da Rocha C., Cardoso C.L., Silva D.H.S., Zanoni M.V.B., *J. Food Compos. Anal.*, **2004**, 17, 619
35. Moreno M., Arribas A.S., Bermejo E., Zapardiel, Chicharro M., *Electrophoresis* **2011**, 32, 877–883
36. R. Arakawa, M. Yamaguchi, H. Hotta, T. Osakai, T. Kimoto, *J. Am. Mass Spectrom.*, **2004**, 15, 1228
37. Newberne P.M., de Camargo J.L.V., Clark A.J., "Choline deficiency, partial hepatectomy, and liver tumors in rats and mice", *Toxicologic Pathology*, **1982**, 10 (2), 95-106
38. Notsu H., Tatsuma T., Fujishima A., *J. Electroanal. Chem.*, 523, **2002**, 86–92
39. Tsiakoulis C.G., Trikalitis P.N., Prodromidis M.I., *Electrochem. Commun.*, 7, **2005**, 1398–1404
40. Sanchez-Moreno C., *Food Sci. Technol. Int.*, **2002**, 8, 121-137

41. Shang L. , Dong S., "Detection of neurotransmitters by a light scattering technique based on seed-mediated, growth of gold nanoparticles" *Nanotechnology*, **2008**, 19 ,095502 (6pp)
42. Ardakani M.M., Beitollahi H., Ganjipour B., Naeimi H., Nejati M., "Electrochemical and catalytic investigations of dopamine and uric acid by modified carbon nanotube paste electrode", *Bioelectrochemistry*, **2009**, 75, 1-8
43. Zammarchi E., "Patologie congenite da neurotrasmettitori", *Neurol. Sci.*, **2004**, 25, 189-192
44. Vanden Berghe P., "Electrochemical detection of neurotransmitters in the gut wall" *Gastenterol. Motil.*, **2008**, 20, 1185-1188
45. Robinson D.L., Hermans A., Seipel A.T., Wightman R.M., "Monitoring rapid chemical communication in the brain", *Chem. Rev.*, **2008**, 106, 2554-2584
46. Yang-Rae K., Sungyool B., Yeon-Joo K., Yongtak Y., Rakesh K.M., Jong Seung K., Hasuck K., *Biosensors and Bioelectronics*, **2010**, 25, 2366–2369
47. Wightman R.M., May L.J., Michael A.C., "Detection of dopamine dynamics in the brain", *Anal. Chem.*, **1998**, 60, 769-799
48. Balcioglu A., Zhang K., Tarazi F.I., "Dopamine depletion abolishes apomorphine- and amphetamine-induced increases in extracellular levels in the striatum of conscious rats: a microdialysis study", *Neuroscience*, **2003**, 119, 1045-1053
49. Lin C., Hsiao C., Hung C., Lo Y., Lee C., Su C., Lin H., Ko F., Huang T., Yang Y., "Ultrasensitive detection of dopamine using a polysilicon nanowire field-effect transistor", *Chem. Commun.*, **2008**, 5749-5751
50. Zachek M.K., Hermans A., Wightman R.M., Mc Carty G.S., "Electrochemical dopamine detection: comparing gold and carbon fiber microelectrodes using background subtracted fast scan cyclic voltammetry", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2008**, 614, 113-120
51. Jan-Wei M., Boidar O., "Simultaneous measurement of dopamine and ascorbate at their physiological levels using voltammetric microprobe based on overoxidized poly (1,2-fenilendiamina)-coated carbon fiber", *Anal. Chem.*, **2001**, 73 (6), 1196-1202



52. Lv M., Wei M., Rong F., Terashima C., Fujishima A., Gu Z., "Electrochemical Detection of Catechol Based on As-Grown and Nanograss Array Boron-Doped Diamond Electrodes", *Electroanalysis*, **2010**, 22, 199 – 203
53. Gordon J.A., Hen R., "The serotonergic system and anxiety" *Neuromolecular Medicine*, **2004**, 5, 27-40
54. Broderick P.A., Phelix C.F., "Serotonin (5-HT) within dopamine reward circuits signals open-field behavior", *Neuroscience and Biobehavioral Review*, **1997**, 21 (3), 227-260
55. Vanden Berghe P., "Electrochemical detection of neurotransmitters in the gut wall", *Gastroenterol. Motil.*, **2008**, 20, 1185-1188
56. Diaz A.F., Bargon J., "Electrochemical synthesis of conducting polymers.", In: Skotheim TA, editor. *Handbook of conducting polymers*, vol. I. New York: Marcel Dekker, **1986**, p. 81-115
57. Malhotra B.D.; Ghosh S., Chandra R., *J. Appl. Polym. Sci.*, **1990**, 40, 1049
58. Neglur, B.R.; Laxmeshwar, N.B., Santhnam, K.S. "*Ind. J. Chem.*", **1994**, 33A, 547
59. Bartlett, P.N.; Caruana, D.J., *Analyst*, **1992**, 117, 1287-1292
60. Groom C.A., Luong J.H.T., *Anal Lett*, **1993**, 26, 1383-1390
61. Gerard M., Chaubey A., Malhotra B.D., "Application of conducting polymers to biosensors", *Biosensors Bioelectron*, **2002**, 17, 345-59
62. Kanazawa A.F., "Electrochemical polymerization of pyrrole", *J Chem Soc Chem Commun*, **1979**, 635
63. Dall'Olio A., Dascola G., Varacco V., Bocchi V., "Electron paramagneticresonance and conductivity of an electrolytic oxypyrrole [(pyrrole polymer)] black", *C R Acad Sci Ser C*, **1968**, 267, 433-435
64. Sternberg R., Bindra D., Wilson G.S., Thevenot D.R., *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2781
65. Moussy F., Jakeways S., Herrison D.J., Rajotte R.V., *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 3882
66. Lowry J.P., McAteer K., El Atrash S.S., Duuff A., O'Neill R.D., *Anal Chem*, **1994**, 66, 1754-1761
67. Palmisano F., Guerrieri A., Quinto M., Zambonin P.G., *Anal Chem*, **1995**, 61, 1005-1009

68. Nakabayshi Y., "Amperometric glucose sensors fabricated by electrochemical polymerization of phenols on carbon paste electrodes containing ferrocene as electron transfer mediator", *Anal. Sci.*, **1998**, 14, 1069-1077
69. Nakabayshi Y., Yoshikawa H., "Amperometric biosensors for sensing of hydrogen peroxide bases on electron transfer between horseradish peroxidase and ferrocene as a mediator", *Anal. Sci.*, **2000**, 16, 609-61
70. Jang D.H., "Electropolymerization mechanism for poly-o-phenylendiamine (PPD) and its electrocatalytic behaviour for O<sub>2</sub> reduction" *Bull. Korean Chem. Soc.*, **1995**, 16, 392-397
71. Martinusz K., "Impedance analysis of poly-o-phenylendiamine electrodes", *J. Electroanal.Chem.*, **1997**, 433, 1-8
72. Street G.B., "Polypyrrole: from powders to plastic." In: Skotheim TA, editor. *Handbook of conducting polymers*, vol. I. New York: Marcel Dekker; **1986**, 265-291
73. Shirakawa H., Louis E.J., MacDiarmid A.G., Chiang C.K., Heeger A.J., "Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivates, (CH)<sub>x</sub>", *J Chem Soc Chem Commun*, **1977**, 578-580
74. Heeger A.J., "Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials (Nobel Lecture)", *Angew Chem Int Ed*, **2001**, 40, 2591-611
75. Feast W.J., "Synthesis of conducting polymers." In: Skotheim TA, editor. *Handbook of conducting polymers*, vol. I. New York: Marcel Dekker, **1986**, 1-43
76. Kundu K., Giri D., "Evolution of electronics structure of cyclic polythiophene upon bipolaron doping." In: *Phys*, **1996**, 105, 11075-80
77. Hong S.Y., Marnik D.S., "Understanding the conformational stability and electronic structure of modified polymers based on polythiophene", *Macromolecules*, **1992**, 4652-4657
78. Dietrich M., Hemze J., Heywang G., Jonas F., *J. Electroanal. Chem.*, **1994**, 369, 87
79. Heeger A.J., "Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials", *Synth Met*, **2002**, 125, 23-42
80. Gurunathan K., Murugan A.V., Marimuthu R., Mulik U.P., Amalnerkar D.P., "Electrochemically synthesized conducting polymeric materials for applications

- towards technology in electronics, optoelectronics and energy storage devices”, *Mater Chem Phys*, **1999**, 61, 173-91
81. Foulds N.C., Lowe C.R., “Enzyme entrapment in electrically conducting polymers”, *J Chem Soc Faraday Trans*, **1986**, 82, 1259-64
  82. Umana M., Waller J., “Protein modified electrodes: the glucose/oxidase/polypyrrole system”, *Anal Chem*, **1986**, 58, 2979-83
  83. Wong J.Y., Langer R., Ingber D.E., “Electrically conducting polymers can noninvasively control the shape and growth of mammalian cells”, *Proc Natl Acad Sci, USA*, **1994**, 91, 3201-4
  84. Shi G., Rouabhia M., Wang Z., Dao L.H., Zang Z., “A novel electrically conductive and biodegradable composite made of polypyrrole nanoparticles and polylactide”, *Biomaterials*, **2004**; 25, 2477-88
  85. Weiland J.D., Anderson D.J., “Chronic neural stimulation with thin-film, iridium oxide electrode”, *IEEE Trans Biomed Eng*, **2000**, 47, 911-8
  86. Beck F., Braun P., Oberst M., Ber. Bunsegens. Phys. Chem., **1987**, 91, 967
  87. Ge H., Qi G., Kang E., *Polymer*, **1994**, 35, 504
  88. Otero T.F., Márquez M., Suárez I., *J. Phys. Chem.*, **2004**, 108, 15429
  89. Gao Z., Zi M., Chen B., *J. Electroanal. Chem.*, **1994**, 373, 141
  90. Lewis T.W., Wallace G.G., Kim C.Y., D.Y. Kim, *Synt. Met.*, **1997**, 84, 403
  91. Ghosh S., Bowmaker G.A., Cooney R.P., Seakins J.M., *Synt. Met.*, **1998**, 95, 63
  92. Rogers R.D., Seddon K.R., “Ionic Liquids: Industrial Applications to Green Chemistry” *ACS Symposium Series*, **2002**, 818. American Chemical Society: Washington, DC
  93. Chiappe C., Peraccin D., Review Commentary “Ionic Liquid: solvent properties and organic reactivity”; *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, 18, 275-29
  94. Marconi W., Martinelli A., Piozzi A., D. Zane, *Biomaterials*, **1992**, 13 (7), 432-43
  95. Marconi W., Martinelli A., Piozzi A., D. Zane, *Eur. Polym.*, **1991**, 27 (2), 135-139
  96. Jacob H., Grainer D., Okano T., Kim S.W., “Surface modification for Improved Blood Compatibility”, *Artif. Organs*, **1988**, 12, 506-507
  97. Kim Y.H., Jeong D.H, Ahn K.D., “Surface modification of polyurethane for enhanced blood compatibilità”, *Markromol. Symp.*, **1990**, 33, 319-326

98. Mohammad S.F., Olsen D.B., "Reduced platelet adhesion and activation for coagulation factors of polyurethane treated with albumin-IgG complex", *Trans. Am. Soc. Intern. Organs*, **1986**, 32, 323-326
99. Labarre D., Jozefowicz M., Boffa M., "Properties of heparin-poly(methyl methacrylate) copolymers II", *J. Biomed. Mater. Res.*, **1977**, 11, 283-295
100. Evangelista A., Sefton M.V., "Coating of two polyether-polyurethanes and polyethylene with a heparin- poly(vinyl alcohol) hydrogel", *Biomaterials*, **1986**, 7, 206-211
101. Grasel T.G., Pierce J.A., Cooper S.L., "Effects of alkyl grafting on surface properties of polyurethane block copolymers", *J. Biomed. Mater. Res.*, **1987**, 21, 815-842
102. Okkema A.Z., Frabizius D.J., Grasel T.G., Cooper S.L., Zdrahala R.J., "Bulk, surface and blood-conducting properties polyether-polyurethanes modified with polydimethylsiloxane macroglycols", *Biomaterials*, **1989**, 10, 23-32
103. Grainger D.W., Kim S.W., Ferijen J., "Poly(dimethylsiloxane)-poly(ethylene oxide) heparine block copolymers. I. Synthesis and characterization", *J. Biomed. Mater. Res.*, **1988**, 22, 231-249
104. Shibuta R., Tanaka M., Sisido M., Imanishi Y., "Synthesis of novel polyaminoetherurethaneureas and development of antithrombogenic materials by their chemical modifications", *J. Biomed. Mater. Res.*, **1986**, 20, 971-987
105. Ito Y., Sisido M., Imanishi Y., "Platelet adhesion onto protein-coated and uncoated polyetherurethaneurea having tertiary amino groups in the substituents and its derivatives", *J. Biomed. Mater. Res.*, **1989**, 23, 191-206
106. Ito Y., Sisido M., Imanishi Y., "Synthesis and anti thrombogenicity polyurethaneurea having tertiary amino groups in the side chains and of the polymer/heparin complex", *J. Biomed. Mater. Res.*, **1986**, 20, 1017-1033
107. Grasel T.G., Cooper S.L., *J. Biomed. Mater. Res.*, **1989**, 23, 311
108. Han D.K., Jeong S.Y., Kim Y.H., Min B.G., Cho H.I., *J. Biomed. Mater. Res.*, **1991**, 25, 561
109. Silver J.H., Hart A.P., Williams E.C., Cooper S.L., Charef S., Labarre D., Jozefowicz M., *Biomaterials*, **1992**, 13, 339
110. Park K.D., Okano T., Nojiri C., Kim S.W., *J. Biomed. Mater. Res.*, **1988**, 22, 977

111. Dieckmann W., Breest F., Berichte, **1906**, 39, 3052
112. Naegeli C., Tyabji A., Helv. Chim. Acta, **1934**, 17, 931
113. Shyh-Chyang L., Emril M.A., Natalia C.T., Hsiao-Hua Y., Shujun, G., Eric A.B.K., Jackie Y.Y., Langmuir, **2008**, 24, 15
114. Heywang, G., Jonas, F., Adv. Mater., **1992**, 4, 117
115. Groenendaal B.L., Jonas F., Freitag D., Pielartzik H., Reynolds J. R., Adv. Matter., **2000**, 12, 481
116. Groenendaal, B. L., Zotti G., Aubert P.H., Waybright S.M., Reynolds J.R., Adv. Mater., **2003**, 15, 855
117. Roncali J., Blanchard P., Frère P.J., Mater. Chem., **2005**, 15, 1589
118. Kirchmeyer S., Reuter K.J., Mater. Chem., **2005**, 15, 2077
119. Jonas F., Krafft W., Muys B., Macrol. Symp., **1995**, 100, 169
120. Morrison F. J.T.; Synt. Met., **1997**, 87, 171
121. Roman L.S.; Andersson, M.R., Johannes T., Inganäs O., Adv. Mater., **1997**, 9, 1164
122. Arias A. C., Granström M., Thomas D.S., Petritsch K., Friend R.H., Phys. Rev. B, **1999**, 60, 1854
123. McQuade D.T., Pullen A.E., Swager T.,M., Chem. Rev., **2000**, 100, 2537
124. Martin D.C., Nat. Mater., **2007**, 6, 626
125. Richardson-Burns S.M., Hendricks J.L., Neural.Eng., **2007**, 4, L6
126. Groenendaal B.L., Jonas F., Freitag D., Pielartzik H., Reynolds J.R., Adv Mater. 12, **2002**, 481-494
127. Chen J., Heeger A.J., Wuld F., Solid state Commun, **1986**, 58, 25
128. Van Haare J.A., Havinga A.A., Van dongen J.L.J., Jansen R.A.J., Cornil J., Bredas J.L., Chem Eur. J., **1998**, 4, 1509
129. Harima Y., Eguchi T., Yamashita K., Kojama K., Shiotani M.. Synth. Met., **1999**, 105, 121-128
130. Zykwincka A., Domagala W., Lapkowski M., "ESR spectroelectrochemistry of poly(3,4ethylenedioxythiophene) (PEDOT)", Electrochemistry Communication 5, **2003**, 603-608
131. Khan Ahmed S., "An overview of nanotechnology and nanoscience", Nanotechnology for telecommunications, **2010**, 1-22

132. Michael F., Hochella Jr., "Nanoscience and technology: the next devolution in the Earth science Earth and Planetary", *Science Letters*, **2002**, 203(2), 593-605
133. Valcarcel M., Simonet B.M., Cardenas S., "Analytical nanoscience and nanotechnology today and tomorrow", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2008**, 391(5), 1881-1887
134. Jianrong, Yoqing, Nongyue, Xiaohua, Sijiao, "Nanotechnology and Biosensors" *Biotechnology Advances*, **2004**, 22(7) 505-518
135. Ramanavičius A., Ramanavičiene A., Malinauskas A., "Electrochemical sensors based on conducting polymer-polypyrrole", *Electrochimica Acta*, **2006**, 51, 6025-6037
136. Xu, Chen, Dong, Shaojun, "Electrochemical biosensors based on advanced bioimmobilization matrices", *Trends in analytical chemistry*, **2006**, 25 (9), 899-908
137. Wang J., "Nanomaterial-based electrochemical biosensor", **2005**, 130, 421-426
138. Zhang, Xueqing, Guo, Qin, Cui, Daxiang, "Recent avances in nanotechnology applied to biosensor", *Sensors*, **2009**, 9 (12), 1033-1053
139. Apel P., *Radiat. Meas.*, **2001**, 34, 559
140. Diggle J.D., Downie T.C., Gouling C.W., *Chem. Rev.*, **1969**, 69, 365
141. Despie A., Patkhutik V.P., "Modern Aspect of Electrochemistry", edited, J. O'M. Bockris, R.E. White, B.E. Conway, Plenum Press., New York, **1989**, vol. 20, p.401
142. Pra L.D.D., Ferain E., Legras R., Demoustier-Champagne S., *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B*, **2002**, 196, 81
143. Martin C.R., Mitchell D.T., *Electroanalytical Chemistry, a Series of Advances*, edited A.J. Bard, I. Rubinstein, Marcel Dekker, New York, **1999**, vol.21 p.1
144. Moretto L.M., Pepe N., Ugo P., *Talanta*, **2004**, 62, 1055
145. Lee H.J., Beriet C., Ferrigno R., Girault H.H., *J. Electroanal. Chem.*, **2001**, 502, 138
146. Hulteen J.C., Menon V.P., Martin C.R., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1996**, 92, 4029
147. Cheng J.F., Whiteley L.D., Martin C.R., *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 762
148. Menon V.P., Martin C.R., *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 1920

149. Hulteen J.C., Menon V.P., Martin C.R., J. Chem. Soc. Faraday Trans., **1996**, 92, 4029
150. Ugo P., Moretto L.M., Vezzà F., ChemPhysChem, **2002**, 3, 917
151. Ugo P., Moretto L.M., Vezzà F., in Sensors Update, edited H.Baltes, G.K. Fedder, J.G. Korvink, Wiley-WCH, Weinheim **2003**, vol.12, p.121
152. Ugo P., Moretto L.M., Bellomi S., Menon V.P., Martin C.R., Anal.Chem., **1996**, 68, 4169
153. Jeonng E., Galow T.H., Shotter J., Bal M., Ursache A., Tuominen M.T., Stafford C.M., Russel T.P., Rotello V.M., Langmuir, **2001**, 17, 6396
154. Amatore C., Saveant J.M., Tessier D., J. Electroanal. Chem., **1983**, 147, 39
155. Bard A.J., Faulkner L., Electrochemical Methods, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley, New York, **2000**
156. Sabatani E., Rubistein J., J. Phys. Chem., **1987**, 91, 6663
157. Brunetti B., Ugo P., Moretto L.M., Martin C.R., J. Electroanal. Chem., **2000**, 491, 166
158. Krishnamoorthy K., Zoski C.G., "Fabrication of 3D Gold Nanoelectrode Ensembles by Chemical Etching", Anal.Chem., **2005**, 77, 5068-5071
159. Shao P., Ji G., Chen P., "Gold nanotube membranes: Preparation, characterization and application for enantioseparation" J.of Membrane Science, **2005**, 255, 1-11.
160. Rogers R.D., Seddon K.R., "Ionic Liquids: Industrial Applications to Green Chemistry" ACS Symposium Series 818. American Chemical Society: Washington, DC, **2002**
161. Chiappe C., Peraccini D., Review Commentary "Ionic Liquid: solvent properties and organic reactivity", J. Phys. Org. Chem., **2005**, 18, 275-297
162. Fremantle M., Chem. Eng. News, **1998**, 76, 32-37
163. Cooper E.; Sullivan E.J.M., Gale R.J., Blomgren G., Kojima H., Eds.; The electrochemical Society Proceedings Series; Electrochemical Society: Pennington, NJ, **1992**; Vol. 92-16, p 386
164. Carlin R.T., De Long H., Fuller J., Trulove P.C., J. Electrochem. Soc., **1994**, 141, L73
165. Appetecchi G.B., Montanino M., Zane D. PhD, Carewska M., Alessandrini F., Passerini S., "Effect of the alkyl group on the synthesis and the electrochemical

- properties of N-alkyl-N-methylpyrrolidinium-(bistrifluoromethanesulfonyl)-imide ionic liquids" *Electrochim. Acta*, **2008**, 54(4) 1325-1332
166. Brett C.M.A.; Brett, M.O.; "Electrochemistry: Principles, Methods and applications" pp. 225
  167. Randles J.E.B., *Disc. Faraday soc.*, **1947**, 1, 11
  168. Fernández-Sánchez C., McNeil C.J., Rawson K., "Elettrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: application to biosensor development", *Trends in Analytical Chemistry*, **2005**, 24, 1
  169. Alfonta L., Katz E., Willner I., "Sensing of acetylcholine by a tricomponent-enzyme layered electrode using faradaic impedance spectroscopy, cyclic voltammetry, and microgravimetric quartz crystal microbalance transduction methods", *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 927-935
  170. Katz E., Willner I., "Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors", *Electroanalysis*, **2003**, 15, 913-947
  171. Bard A.J.; Faulkner L.R., "Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications", **2001**, Wiley, New York
  172. Guan J.G., Miao Y.Q., Zhang Q.J., "Review: Impedimetric Biosensors", *J. of Bioscience and Bioengineering*, **2004**, 97(4), 219-226
  173. Saum A.G.E.; Cumming R.H., Rowell F.J., "Use of substrated coated electrodes and AC impedance spectroscopy for the detection of enzyme activity"; *Biosens. Bioelectron.*, **1998**, 13, 511-518
  174. Cottrell F.G., *Z. Physk. Chem.*, **1902**, 42, 385
  175. MacDonald D.D., "Transient techniques in electrochemistry", Plenum, New York, **1977**, Chapter 4
  176. Kaiser A.E., Kaiser M.G., "Supramolecular Electrochemistry" Wiley- Uch, **1999**
  177. Nagy Z., "Modern aspect of electrochemistry", Plenum, New York, Vol.21, **1990**, ed. R.E. White
  178. Bockris J.O'M, Conway B.E., pp 237-292
  179. Borman S., *Anal. Chem.*, **1982**, 54, 698
  180. He H., Avrey J.P., Faulkner L.R., *Anal. Chem.*, **1982**, 54, 1313



181. Bond A.M., "Modern Polarographic methods in Analytical Chemistry", Dekker, new York, **1980**
182. Schuhmann W., Kranz C., Wohlschläger H., Strohmeier J., "Pulse technique for the electrochemical deposition of polymer films on electrode surface", *Biosens. Bioelectro.*, **1997**, 12, 1157-1167
183. Zane D., Appetecchi G.B., Bianchini C., Passerini S., Curulli A., *ECS Transaction*, **2010**, 25 (32), 63-71
184. Beck F., Braun P., Oberst M., *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **1987**, 91, 967-974;
185. Ge H., Qi G., Kang E., *Polymer*, **1994**, 35, 504-508
186. Palmisano F., Malitesta C., Centonze D., Zambonin P.G., *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 2207-2211
187. Debiemme-Chouvy C., "A very thin overoxidized polypyrrole membrane as coating for fast time response and selective H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amperometric sensor", *Biosensors and Bioelectronics*, **2010**, 25, 2454-2457
188. Cho J. H.; Shin M.C.; Kim H.S., "Electrochemical adsorption of glucose oxidase onto polypyrrole film for a glucose biosensor", *Sensors and Actuators B*, **1996**, 30, 137-141
189. D. Zane, G.B. Appetecchi, C. Bianchini, S. Passerini, A. Curulli, *Electroanalysis*, **2011**, 23(5), 1134 – 1141
190. Jirage K.B, Hulteen J.C., Martin C.R., *Science*, **1997**, 278, 655
191. Randles, J.E.B., *Trans. Faraday Soc.*, **1952**, 48, 828-832
192. Nishizawa M., Menon V.P., Martin C.R., *Science*, **1995**, 268, 1920
193. Brumlik C.J., Menon V.P., Martin C.R., *J. Mater. Res.*, **1994**, 9, 1175
194. Badea M., Curulli A., Palleschi G., *Biosensors and bioelectronics*, **2003**, 18, 689-698
195. Dongxue H., Guifu Y., Jixia S., Li N., Ari I., "Morphology of electrodeposited poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/poly(4-styrene sulfonate) films", *Elsevier B.V.*, **2006**
196. Pei Q. B., Zuccarello G., Ahlskog M., Inganäs O., *Polymer*, **1994**, 35, 1347
197. Sundfors F., Bobacka J., Ivaska A., Lewenstam A., "Kinetics of electron transfer between Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) studied by electrochemical impedance spectroscopy", *Elsevier Science Ltd*, **2002**

198. Waterston K., Wang J.W., Bejan D., Bunce N.J., "Electrochemical waste water treatment: Electrooxidation of acetaminophen", *Journal of Applied Electrochemistry*, **2006**, 36(2), 227-232
199. Miner D.J., Rice J.R., Piggin R.M., Kissinger P.T., *Anal.Chem.*, **1981**, 53, 2258
200. Van Benschoten J.J., Lewis J.Y., Heineman W.R., Roston D.A., Kissinger P.T., *J. Chem. Educ.*, **1983**, 60, 772
201. Rueda M.; Aldaz A.; Burgos F.S., *Electrochim. Acta*, **1978**, 23, 419-426
202. Kalakodimi R.P., Nookala M., "Electrooxidation of Ascorbic Acid on a Polyaniline-Deposited Nickel Electrode: Surface Modification of a Non-Platinum Metal for an Electrooxidative Analysis", *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 5531-5537
203. Trabelsi S.K., Tahar N.B., Abdelhedi R., "Electrochemical behavior of caffeic acid", *Electrochimica Acta*, **2004**, 49, 1647-1654
204. John M., Gumbinger H.G., Winterhoff H., *Planta Med*, **1990**, 56, p. 14
205. Nahrstedt A., Albrecht M., Wray V., Gumbinger H.G., John M., Winterhoff H., Kemper F.H., *Planta Med.* **1990**, 56, p. 395
206. Fulcrand H., Cheminat A., Brouillard R., Chenier V., *Phytochemistry*, **1994**, 35, p. 499
207. Giacomelli C. i, Ckless K., Galato D., Miranda F.S., Spinelli A., *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, 13, p. 332
208. Zare H.R. Golabi S.M., *J. Solid State Electrochem.*, **2000**, 4, p. 87
209. Hapiot P., Neudeck A., Pinson J., Fulcrand H., Neta P., Rolando Ch., *J. Electroanal. Chem.*, **1996**, 405, p. 169
210. Amadalli R., De Battisti A., Girenko D.V., Kovalyov S.V., Velichenko A.B., *Electrochim. Acta*, **2000**, 46, p. 341
211. Volk K.J., Yost R.A., Brajter-Toth A., "On-Line Electrochemistry/Thermospray/Tandem Mass Spectrometry as a New Approach to the Study of Redox Reactions: The Oxidation of Uric Acid", *Anal. Chem.* **1980**, 61, 1709-1717
212. Dryhurst G., *Electrochemistry of Biological Molecules* ; Academic Press: New York, **1977**
213. Dryhurst O., *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1985**, 14, 251

214. Brajter-Toth A., Goyal R.N., Wrona M., Lacava T., Nguyen N.T., Dryhurst G., Bioelectrochem. Bioenerg., **1981**, 8, 413
215. Goyal R.N., Brajter-Toth A., Dryhurst G., J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem., **1982**, 13(1), 18
216. Dryhurst G., Kadish K.M., Scheller F., Renneberg R., Biological Electrochemistry, Academic Press: New York, **1982**
217. Brajter-Toth A., Dryhurst G.J., Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem., **1981**, 122, 205
218. Mei L.V., Wei M., Rong F., Terashima C., Fujishima A., Gu Z., "Electrochemical Detection of Catechol Based on As-Grown and Nanograss Array Boron\_Doped Diamond Electrodes" Electroanalysis, Doi: 10.1002/elan.200900296 pubblicato on line
219. Nematollahi D., Afkhami A., Tammari E., Shariatmanesh T., M. Hesari T., Shojaeifard M., "An efficient electrochemical synthesis of diamino-o-benzoquinone: Mechanistic and kinetic evaluation of the reaction of azide ion with o-benzoquinone", Chem. Commun, **2007**, 162-164
220. Hosseini M., Momeni M.M., Faraji M., J Appl Electrochem, 2010, 40, 1421–1427
221. Li M., Liu C., Xiang Q., Xie S., Yao C., "Electrochemical quartz crystal microbalance study on growth and property of the polymer deposit at gold electrodes during oxidation of dopamine in aqueous solutions" Thin Solid Films, **2006**, 497, 270-278
222. Tao Z., Wang G., Goodisman J., Asefa T., "Accelerated Oxidation of Epinephrine by Silica Nanoparticles", Langmuir, **2009**, 25(17), 10183–10188
223. Misra H.P.; Fridovich I.J., Biol. Chem., **1972**, 247, 3170–3175
224. Babior B.M., Kipnes R.S., Blood, **1976**, 47, 461–471
225. Alhasan R., Njus D., Anal. Biochem., **2008**, 381, 142–147
226. Borg D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **1965**, 53, 829–836
227. Ball E.G., Chen T.T., J. Biol. Chem., **1933**, 102, 691–719
228. Adak S., Bandyopadhyay U., Bandyopadhyay D., Banerjee R.K., Biochemistry **1998**, 37, 16922–1693
229. Kitamura Y., Mifune M., Takatsuki T., Iwasaki T., Kawamoto M., Iwado A., Chikuma M., Saito Y., Catal. Commun., **2007**, 9, 224–228

230. Ryan T.P., Miller D.M., Aust S.D., J. Biochem. Toxicol., **2006**, 8, 33–39
231. Anne A., Moiroux J., “Electrochemical oxidation of 5-Hydroxytryptamine in acidic aceto nitrile”, J. Org. Chem., **1998**, 53, 2816-2820
232. Henstridge M.C., Wildgoose G.G., Compton R.G., “Generator/Collector experiments with a single electrode: introduction and application to exploring the oxidation mechanism of serotonin” J. Phys. Chem. C, **2009**, 113, 14285-14289
233. Wrona M.Z., Dryhurst G.; “ Electrochemical oxidation of 5- Hydroxytryptamine in acidic aqueous solution”, J. Org. Chem, **1989**, 54, 2718-2721
234. King R.E., Bomser J.A., Min D.B., “Bioactivity of resveratrol. Comprehensive Review” in Food Science and Food Safety, **2006**, 5, 65-70
235. Santos-Buelga C., Scalbert A., “Proanthocyanidins and tannin-like compounds- nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health”, Journal of Science of Food and Agriculture, **2000**, 80, 1094-1117
236. Cooper K.A., Chopra M., Thurnham D.I., “Wine polyphenols and promotion of cardiac health”, Nutrition Research Review, **2004**, 17, 111-129
237. Teissedre P.L., Frankel E.N., Waterhouse A.L., Peleg H., German J.B., “Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines”, Journal of Science of Food and Agriculture, **1996**, 64, 501-509
238. De Beer D., Harbetson J.F., Kilmartin P.A., Roginsky V., Barsukova T., Adams D.O., “Phenolics: A comparison of diverse analytical methods, American Journal of Enology and Viticulture”, **2004**, 55, 389-400
239. Kilmartin P.A., Zou H., Waterhouse A.L., “A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2001**, 49, 1957-1965
240. Kilmartin P.A., Zou H., Waterhouse A.L., “Correlation of wine phenolic composition versus cyclic voltammetry response”, American Journal of Enology and Viticulture, **2002**, 53, 294-302
241. Fracassetti D., Lawrence N., Tredoux A.G.J., Tirelli A., Nieuwoudt H.H., Du Toit W.J., “Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method”, Food Chemistry, **2011**, 128, 1136–1142

- 242. Curulli A., Di Carlo G., Ingo G.M., Riccucci C., Zane D., Bianchini C., "Chitosan stabilized gold nanoparticles Au modified electrodes for the determination of polyphenol index in wines: a preliminary study", *Electroanalysis* DOI: 10.1002/elan.201100583
- 243. Bunz U.H.F., "Breath Figures as a Dynamic Templating Method for Polymers and Nanomaterials", *Advanced Materials*, **2006**, Vol 18 pp 973-983
- 244. Malhotra B.D., Ghosh S., Chandra R., *J. Appl. Polym. Sci.*, **1990**, 40, 1049
- 245. Neglur B.R., Laxmeshwar N.B., Santhnam K.S., *Ind. J. Chem.*, **1994**, 33A, 547
- 246. Bartlett P.N., Caruana D.J.; *Analyst*, **1992**, 117, 1287-1292

## Attività formative

1. Partecipazione al Workshop “Spettrometria di massa quantitativa, tecniche imaging e di screening per la determinazione di proteine e farmaci” organizzato dalla Società Chimica Italiana – Divisione di Chimica Analitica (gruppo Divisione di Bioanalitica) presso il Dipartimento di Chimica dell’Univerisà “La Sapienza” di Roma il 4 e 5 Dicembre 2008.
2. Partecipazione al Workshop “Nanotech-Lazio: Panoramica sulle Nanoscienze” organizzato dall’Istituto di Metodologie Chimiche presso il Dipartimento di Chimica dell’Univerisà “La Sapienza” di Roma nel giorno 22 Aprile 2009.
3. Partecipazione al Workshop “Screening and confirmatory methods for the determination of heavy metals in food” organizzato da BioCop presso l’Università “Tor Vergata” di Roma nei giorni 2 e 3 Luglio 2009.
4. Partecipazione al “216<sup>th</sup> ECS Meeting” di Vienna (Austria) dal 4 al 9 Ottobre 2009 come lecture per il lavoro "Pulsed electrosynthesis of polypyrrole in N-butyl-N-methyl-pyrrolidinium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide ionic liquid for electrochemical sensors".
5. Vincitrice di assegno per lo svolgimento di attività didattiche, integrative, propedeutiche o di recupero per il corso di Chimica per la facoltà di Ing. Chimica ed Ing. Energetica per l’anno accademico 2008/2009 per un totale di 150h (Università “Sapienza” di Roma).
6. Vincitrice di assegno per lo svolgimento di attività didattiche, integrative, propedeutiche o di recupero per il corso di Chimica per la facoltà di Ing. Chimica ed Ing. Energetica per l’anno accademico 2009/2010 per un totale di 30h (Università “Sapienza” di Roma)..
7. Partecipazione alla sessione di poster del “20<sup>th</sup> Anniversary World Congress on Biosensors” a Glasgow (UK) dal 26 al 28 Maggio 2010.
8. Vincitrice di assegno per lo svolgimento di attività didattiche, integrative, propedeutiche o di recupero per il corso di Chimica per la facoltà di Ing. Chimica ed Ing. Energetica per l’anno accademico 2010/2011 per un totale di 150h (Università “Sapienza” di Roma).

9. Vincitrice di 3 assegni per lo svolgimento di attività didattiche, integrative, propedeutiche o di recupero per il corso di Chimica per la facoltà di Ing. Chimica ed Ing. Energetica per l'anno accademico 2010/2011 per un totale di 70h (Università "RomaTre" di Roma).
10. Partecipazione al workshop "GS2011 - IV Workshop del Gruppo Sensori della Divisione di Chimica Analitica della Società Chimica Italiana" organizzato dalla Facoltà di Agraria dell'Università di Teramo nei giorni 15 – 17 Giugno 2011.

## Pubblicazioni

- “Electrosynthesis of poly(o-phenylenediamine) in a room temperature ionic liquid. Part II: assembling of interference-free glucose electrochemical biosensor.” Curulli, Antonella; Bianchini, Chiara; Zane, Daniela. *Sensor Letters* (2009), 7(6), 1030-1038.
- "Pulsed electrosynthesis of polypyrrole in N-butyl-N-methyl-pyrrolidinium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide ionic liquid for electrochemical sensors". D. Zane, G.B. Appetecchi, C. Bianchini, S. Passerini, A. Curulli. *ECS Transaction*, (2010), 25 (32), 63-71.
- “A Comparative Study Of Bismuth-Modified Screen-Printed Electrode For Lead Detection (Part One)”, J. Calvo Quintana, F. Arduini, A. Amine, F. Punzo, G. Li Destri, C. Bianchini, D. Zane, A. Curulli, G. Palleschi, D. Moscone, *Analytica Chimica Acta*, PII: S0003-2670(11)01221-9, DOI: doi:10.1016/j.aca.2011.08.052, Reference: ACA 231415
- “An Impedimetric Glucose Biosensor Based on Overoxidized Polypyrrole Thin Film” D.Zane, G.B. Appetecchi, C. Bianchini, S. Passerini, A. Curulli, *Electroanalysis*, 23, 5, 1134-1141 (2011)
- “Electrochemical sensing platform based on Single Walled Carbon Nanotubes (SWCNTs)/Gold”, A. Curulli, D. Zane, C. Bianchini, *Electrocatalysis*, DOI 10.1007/s12678-011-0073-y
- “Chitosan stabilized gold nanoparticles Au modified electrodes for the determination of polyphenol index in wines: a preliminary study”, Curulli A., Di Carlo G., Ingo G.M., Riccucci C., Zane D., Bianchini C., *Electroanalysis*, DOI: 10.1002/elan.201100583



## Ringraziamenti

Questa tesi non sarebbe stata scritta senza il contributo di molte persone: ogni impegno, infatti, non viene realizzato solo da chi lo affronta ma esso è il risultato di numerosi suggerimenti, spunti e confronti.

Pertanto desidero ringraziare il **Dott. Stefano Passerini** e il **Dott. Giovanni Battista Appetecchi** dell'Ente Nazionale per l'Energia e l'Ambiente (ENEA) per aver fornito il liquido ionico PYR<sub>14</sub>TFSI e il **Prof. Andrea Martinelli** del Dip. di Chimica dell'Università "Sapienza" di Roma per aver fornito il polimero PEUA necessari per aver potuto affrontare questo studio di materiali elettrodi in modo innovativo ed originale.

Un ringraziamento affettuoso va alla **Dott.ssa Daniela Zane** dell'Istituto di Materiali Nanostrutturati del Consiglio Nazionale della Ricerca (CNR- ISMN) per avermi affiancato durante i tre anni di dottorato e alla **Dott.ssa Antonella Curulli** per la disponibilità e la valida assistenza ricevuta nella elaborazione del presente lavoro.

*Chiara Bianchini*

## *Citazione*

*"Il cielo stellato sopra di me,*

*la legge morale dentro di me"*

*Immanuel Kant, "La critica della ragion pratica", 1788*